

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 615.324:577.112
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-199-206>

Поступила в редакцию 29.01.2018
Received 29.01.2018

Т. И. Терпинская¹, А. В. Осипов², С. Б. Кондрашова¹, В. С. Улащик¹, Ю. Н. Уткин²

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-КОБРАТОКСИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ИНДУЦИРОВАННЫЙ БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДОЙ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С6

Аннотация. На модели клеток глиомы С6 показано, что роль никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) в регуляции окислительно-восстановительного баланса по-разному проявляется в различных условиях культивирования. В бессывороточной среде ингибитор nAChR альфа-кобратороксин противодействует окислительному стрессу, повышая активность супероксиддисмутазы и каталазы, уровень восстановленного глутатиона и снижая концентрацию малонового диальдегида.

Ключевые слова: никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, альфа-кобратороксин, супероксид, глутатион, супероксиддисмутаза

Для цитирования: Влияние альфа-кобратороксин на окислительный стресс, индуцированный бессывороточной средой в клетках глиомы С6 / Т. И. Терпинская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2018. – № 2. – С. 199–206. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-199-206>

T. I. Terpinskaya¹, A. V. Osipov², S. B. Kondrashova¹, V. S. Ulashchik¹, Y. N. Utkin²

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

EFFECT OF ALPHA-COBRATOXIN ON THE OXIDATIVE STRESS INDUCED BY A SERUM-FREE MEDIUM IN C6 GLIOMA CELLS

Abstract. The model studies on C6 glioma cells showed that the role of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in the regulation of the redox balance varies under different cultivation conditions. In a serum-free medium, the inhibitor of nAChR alpha-cobratoxin alleviates the oxidative stress that is manifested in an increase in the activity of superoxide dismutase and catalase, the level of reduced glutathione and in a decrease in the concentration of malonic dialdehyde.

Keywords: nicotinic acetylcholine receptors, alpha-cobratoxin, superoxide, glutathione, superoxide dismutase

For citation: Terpinskaya T. I., Osipov A. V., Kondrashova S. B., Ulashchik V. S., Utkin Y. N. Effect of alpha-cobratoxin on the oxidative stress induced by a serum-free medium in C6 glioma cells. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Serya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, no. 2, pp. 199–206 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-199-206>

Введение. Окислительный стресс является результатом дисбаланса между количеством образующихся в клетке активных форм кислорода и ее способностью нейтрализовать реакционно-способные продукты. Нарушения в нормальном окислительно-восстановительном состоянии клеток могут вызывать токсические эффекты вследствие повреждения белков, липидов и ДНК реакционноспособными формами кислорода, такими как производимые митохондриями пероксиды и свободные радикалы. Помимо этого, некоторые реактивные формы действуют как внутриклеточные мессенджеры окислительно-восстановительной сигнализации. Таким образом, окислительный стресс может вызвать нарушения нормальных механизмов клеточной сигнализации. Клетки продуцируют антиоксиданты, которые противостоят вредному воздействию окислительных форм. Эти антиоксиданты разделяют на две основные группы: ферментативные, такие как супероксид-дисмутаза, каталаза, глутатион-S-трансфераза и др., и неферментативные, такие как глутатион, тиоредоксин, витамины А, Е и С, флавоноиды и др.

В регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клетки участвует большое количество ферментов и рецепторных белков. В частности, имеются данные об участии в этом процессе никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР). Последние относятся к суперсемейству лиганд-управляемых ионных каналов и состоят из пяти трансмембранных субъединиц. Фармакологические свойства нАХР зависят от набора субъединиц, составляющих рецептор. Эти рецепторы широко экспрессированы как на нервных клетках, так и на клетках ненейронального происхождения. Наиболее хорошо изучена роль нАХР в передаче нервного импульса. Наряду с этим в последние годы повышенный интерес вызывает изучение функций нейрорецепторов, непосредственно не связанных с передачей нервного сигнала. Так, в ряде экспериментов показано, что активация нАХР способствует развитию окислительного стресса в клетках [1–3]. Это согласуется с тем фактом, что активатор нАХР никотин является фактором риска развития рака бронхов и легких [4], молочной железы [5], хронических болезней почек [6], когда окислительные процессы в организме значительно интенсифицируются.

С другой стороны, стимуляция нАХР может вызывать и уменьшение интенсивности окислительного стресса. Например, показано снижение степени окислительного стресса в клетках микроглии при стимуляции нАХР никотином [7], в нейронах и астроцитах – при активации нАХР ацетилхолином [8] или никотином [9], в клетках мозга мышей – при активации агонистом нАХР $\alpha 7$ -типа [10].

Механизмы участия нАХР в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза изучены недостаточно, а факторы, определяющие роль этих рецепторов в генерации активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защите организма, не выявлены. Это не позволяет сделать вывод о том, при каких условиях активация нАХР будет способствовать нарастанию, а при каких – падению интенсивности окислительного стресса.

Цель данной работы – изучение роли нАХР в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клетки в различных условиях культивирования.

В ряде работ показано, что в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток участвуют нАХР, состоящие из $\alpha 7$ -субъединиц [6, 10]. Поэтому для блокирования нАХР в нашем исследовании использован α -кобратоксин (α -кт) – антагонист гомопентамерных нейронных нАХР, включающих $\alpha 7$ - $\alpha 10$ субъединицы [11]. Ранее в работах [12, 13] было обнаружено, что клетки глиомы С6 экспрессируют нАХР $\alpha 7$ -типа. Учитывая эти данные, нами исследовано влияние α -кт на ряд параметров окислительно-восстановительного баланса клеток глиомы С6. В качестве индукторов стресса применяли культивирование клеток в бессывороточной среде и форболмиристатацетат (ФМА) – активатор протеинкиназы С.

Материалы и методы исследования. *Клеточная линия:* исследование проведено на клетках глиомы С6 крысы (коллекция РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

Реактивы: форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА, Sigma), тиобарбитуровая кислота, тритон X-100, сульфат железа (FeSO_4), азид натрия (AppliChem, Германия), дигидрокверцетин (Sigma, Индия), HCl («Беллехимкомплект», Беларусь), трилон Б, молибдат аммония, перекись водорода, калий фосфорнокислый однозамещенный (K_2HPO_4), калий фосфорнокислый двухзамещенный ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), янтарная кислота («Пять океанов», Беларусь), хлороформ («Экос-1», Россия), метанол (Honeywell, США), ЭДТА (Roth, Германия), 0,9 % NaCl («Несвижский завод медикаментов», Беларусь), феррицианид калия (Chem, Франция); MitoSOX Red, Molecular Probes (Life technologies, США). Выделение α -кт из яда кобры *Naja kaouthia* осуществляли способом, приведенным в работе [14].

Среды и компоненты сред для культивирования: DMEM D6546, антибиотики (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В), раствор Хэнкса, DMSO (Sigma); эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (HyClone, Thermo Scientific).

Методы. Для опыта клеточную суспензию в среде DMEM с добавлением 10 %-ной ЭТС и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В), согласно инструкциям производителя, вносили в чашки Петри (100×20 мм, Corning), культивировали сутки при 37 °С и 5 % CO_2 . Затем среду в чашках заменяли, заливая половину чашек полной, половину – бессывороточной средой, и культивировали в течение суток. После этого в чашки Петри вносили ФМА до

конечной концентрации 100 нМ или α -кт до конечной концентрации 1 нМ или оба препарата в указанных концентрациях. Через 22 ч получали образцы клеток для анализа. Количество проб в каждой серии – 5.

Концентрацию митохондриального супероксида оценивали с помощью красителя MitoSOX Red. Окрашенные согласно рекомендациям производителя клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson) с программным обеспечением Diva 7.0.

Определяли концентрацию и общее количество клеток в чашках Петри. Клетки отмывали от культуральной среды фосфатным буфером и лизировали с помощью специальной смеси, содержащей 10 % 10-кратного концентрированного лизирующего буфера следующего состава: 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1 мМ Na_2 ЭДТА; 1 мМ ЭГТА, 1 % Тритона, 2,5 мМ пиррофосфата натрия, 1 мМ β -глицерофосфата, 4 % ингибитора протеаз и 1 % фенилметилсульфонилфторида. В лизатах клеток определяли активность каталазы – согласно методике [15], активность супероксид-дисмутазы (СОД) – согласно методике [16] с использованием коммерческих тест-систем (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»), содержание малонового диальдегида (МДА) – с помощью метода [17], концентрацию восстановленного глутатиона – по методу [18]. Количество каждого из исследованных показателей приведено из расчета на одну клетку.

Обработку данных проводили стандартными статистическими методами с помощью пакетов программ Statistica 7 и Excel. Нормальность распределения проверяли при помощи теста Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней. Достоверность отличий указана согласно критерию Манна–Уитни. Различия между сериями считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Повышение уровня АФК, к которым относится митохондриальный супероксид, – один из основных признаков развития окислительного стресса. ФМА является индуктором стресса, будучи активатором протеинкиназы С (РКС), участвующей в регуляции окислительного стресса и апоптоза. ФМА способствует переходу ряда изоформ РКС из цитоплазмы в мембраны (в частности, в митохондриальную мембрану), активации РКС и усилению генерации АФК [19, 20].

В наших экспериментах установлено, что ФМА способствовал увеличению уровня митохондриального супероксида в клетках глиомы С6, культивируемых в среде, содержащей сыворотку. Блокатор н-АХР α -кт в 5 раз снижал ФМА-индуцированное повышение уровня митохондриального супероксида (рис. 1). Эти данные свидетельствуют об участии нАХР в развитии ФМА-индуцированного митохондриального стресса.

Механизмы действия нАХР на окислительно-восстановительный баланс клеток раскрыты не полностью. Они могут быть связаны с активацией киназ ERK1/2, JNK, p38, транскрипционного фактора NF- κ B и увеличением соотношения Вах/Bcl-2 [3, 21]. Возможно, при ФМА-индуцированном стрессе играет роль влияние нАХР на внутриклеточное содержание кальция, так как для активации классических изоформ РКС требуются не только ФМА или другие структурные аналоги диацилглицерола, но и ионы кальция [22]. Известно, что нАХР способны эффективно повышать цитоплазматический уровень Ca^{2+} , будучи проницаемы для этих ионов, а также активируя другие типы кальциевых каналов [23].

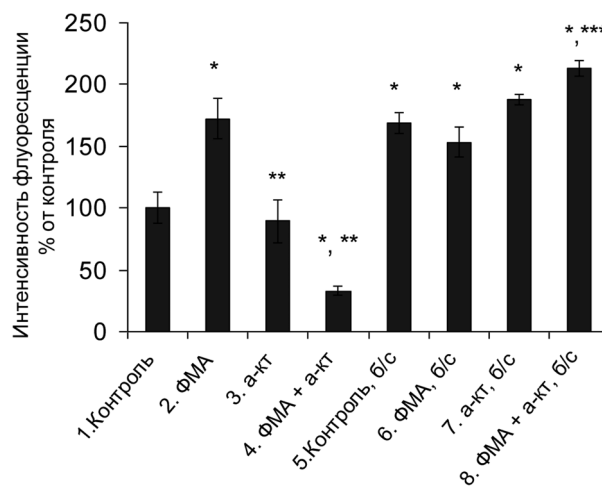


Рис. 1. Влияние форболмирилатацетата (ФМА) и альфа-кобротоксина (α -кт) (б/с – бессывороточная среда) на концентрацию митохондриального супероксида в клетках глиомы С6 (по интенсивности флуоресценции MitoSOX Red). * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем (серия 1), ** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 2, *** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 5

Fig. 1. Influence of phorbol myristate acetate (ФМА) and alpha-cobratoxin (α -ct) (b/c – serum-free medium) on the concentration of mitochondrial superoxide in C6 glioma cells (based on MitoSOX Red fluorescence intensity). * – $p < 0.05$ in comparison to the control (series 1), ** – $p < 0.05$ in comparison to series 2, *** – $p < 0.05$ in comparison to series 5

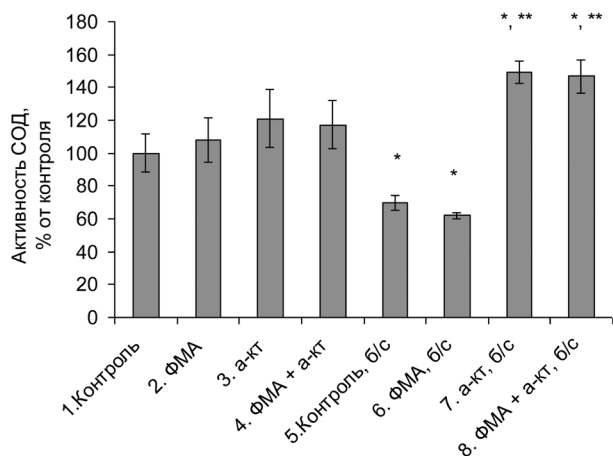


Рис. 2. Влияние форболмирилатацетата (ФМА) и альфа-кобротоксина (α -кт) (б/с – бессывороточная среда) на активность супероксиддисмутазы (СОД) в клетках глиомы С6. * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем (серия 1), ** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 5

Fig. 2. Influence of phorbol myristate acetate (ФМА) and alpha-cobratoxin (α -ct (б/с – serum-free medium) on the activity of superoxide dismutase (SOD) in C6 glioma cells. * – $p < 0.05$ in comparison to the control (series 1), ** – $p < 0.05$ in comparison to series 5

двукратно возрастала, причем эффект не зависел от присутствия ФМА. Возможно, это следствие субстратной активации супероксидом, уровень которого был несколько повышен в бессывороточной среде под влиянием α -кт (см. рис. 1).

Как видно из представленных результатов, ингибирование НАХР при отсутствии ЭТС в среде культивирования связано со значительным увеличением активности СОД. Это дает основание полагать, что функционирующие НАХР способствуют снижению активности фермента.

Еще одним антиоксидантным ферментом является каталаза, разлагающая перекись водорода на воду и молекулярный кислород. Нами не выявлено статистически значимого влияния ФМА

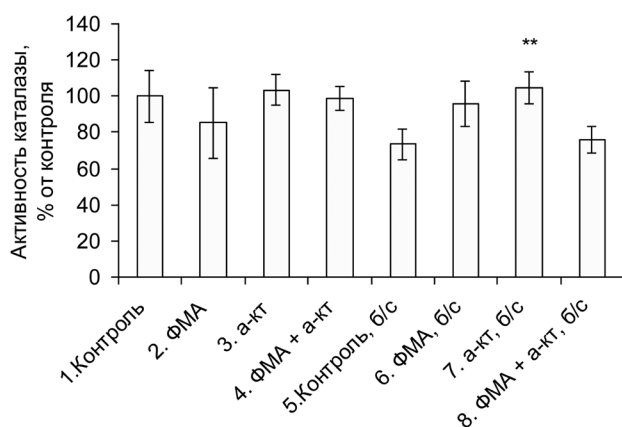


Рис. 3. Влияние форболмирилатацетата (ФМА) и альфа-кобротоксина (α -кт) (б/с – бессывороточная среда) на активность каталазы в клетках глиомы С6. ** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 5

Fig. 3. Influence of phorbol myristate acetate (ФМА) and alpha-cobratoxin (α -ct (б/с – serum-free medium) on catalase activity in C6 glioma cells. ** – $p < 0.05$ in comparison to series 5

Согласно нашим результатам, бессывороточная среда явилась стрессовым фактором и способствовала повышению уровня митохондриального супероксида, который возрастал в еще большей степени при совместном действии ФМА и α -кт. Можно сделать вывод о том, что при отсутствии сыворотки механизмы регуляции окислительного стресса отличаются от таковых в нормальных условиях (при наличии компонентов сыворотки). Возможно, значительное влияние оказывают содержащиеся в сыворотке антиоксиданты, а также ростовые факторы, участвующие в механизмах регуляции окислительного стресса [24–26].

Одним из ферментов, противодействующих развитию окислительного стресса, является СОД, катализирующая дисмутацию супероксид-аниона в перекись водорода и кислород. В наших экспериментах под влиянием α -кт в среде, содержащей сыворотку, наблюдалась тенденция к повышению активности СОД (рис. 2).

В бессывороточной среде под действием α -кт активность этого фермента в клетках культивируемых в присутствии ЭТС. В клетках, культивируемых в бессывороточной среде, активность каталазы имела тенденцию к снижению, а ФМА и α -кт по отдельности (но не вместе) несколько повышали этот показатель (рис. 3).

Глутатион – основной неферментативный антиоксидант клетки. С участием глутатиона восстанавливаются дисульфидные связи, образующиеся между остатками цистеина в белках при окислении. При этом глутатион окисляется и превращается в дисульфид глутатиона. Уровень восстановленного глутатиона восполняется с участием фермента глутатионредуктазы с потреблением НАДФН. Окисленный коэнзим НАДФ+ вновь восстанавливается посредством нескольких ферментов, включая ферменты пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, оксалоацетат-декарбоксилирующую малатдегидрогеназу, НАДФ+-изоционат-дегидрогеназу [27].

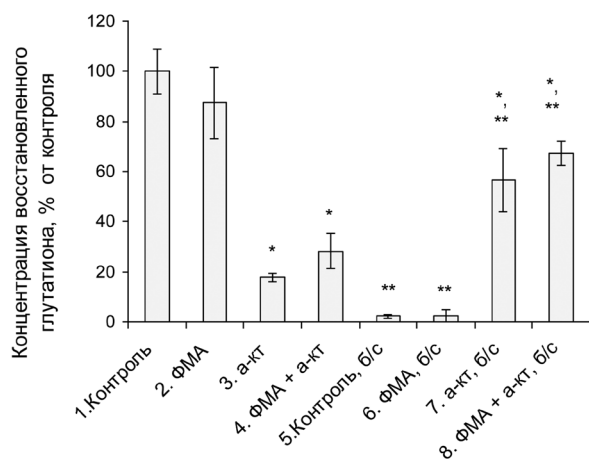


Рис. 4. Влияние форболмиристатацетата (ФМА) и альфа-кобротоксина (α -кт) (б/с – бессывороточная среда) на уровень восстановленного глутатиона в клетках глиомы С6. * – $p < 0,05$ при сравнении с серией 1; ** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 5

Fig. 4. Influence of phorbol myristate acetate (ФМА) and alpha-cobratoxin (α -ct (б/с – serum-free medium) on the level of reduced glutathione in C6 glioma cells. * – $p < 0.05$ in comparison to the control (series 1), ** – $p < 0.05$ in comparison to series 5

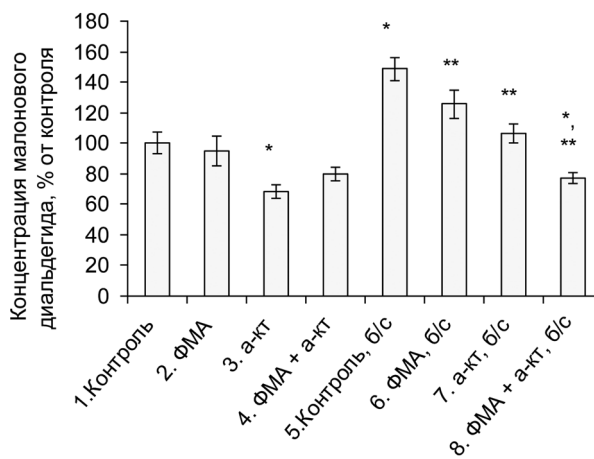


Рис. 5. Влияние форболмиристатацетата (ФМА) и альфа-кобротоксина (α -кт) (б/с – бессывороточная среда) на уровень малонового диальдегида в клетках глиомы С6. * – $p < 0,05$ при сравнении с серией 1; ** – $p < 0,05$ при сравнении с серией 5

Fig. 5. Influence of phorbol myristate acetate (ФМА) and alpha-cobratoxin (α -ct (б/с – serum-free medium) on the level of malonic dialdehyde in C6 glioma cells. * – $p < 0.05$ in comparison to the control (series 1), ** – $p < 0.05$ in comparison to series 5

Нами обнаружено, что в среде, содержащей ЭТС, α -кт в 5 раз снижал концентрацию восстановленного глутатиона в клетках (рис. 4), а в бессывороточной среде его концентрация была еще ниже. Вероятно, активность работы системы восстановления глутатиона зависит от наличия факторов сыворотки и функционирования НАХР. В бессывороточной среде α -кт способствовал росту уровня восстановленного глутатиона. Таким образом, наблюдалось разнонаправленное влияние НАХР на регулирование системы глутатиона в клетках, культивируемых при наличии или отсутствии сыворотки в среде.

МДА является маркером перекисного окисления липидов и одним из классических показателей повреждающего действия окислительного стресса на клеточные структуры.

Нами установлено, что ФМА не оказывал влияния на уровень МДА, а α -кт способствовал снижению его содержания в клетках, культивируемых в среде с ЭТС (рис. 5).

В клетках, культивируемых в бессывороточной среде, количество МДА возрастало. ФМА и α -кт уменьшали концентрацию МДА, особенно в присутствии обоих препаратов.

Возможно, это зависит, по крайней мере частично, от активности СОД, которая имеет тенденцию к повышению под действием α -кт при культивировании клеток в среде, содержащей сыворотку, или статистически достоверно повышается в бессывороточной среде (см. рис. 2). СОД проявляет защитное антиоксидантное действие, и, согласно имеющимся в литературе данным, активность этого фермента в клетках при индукции окислительного стресса обратно коррелирует с уровнем МДА [28].

В целом полученные нами результаты демонстрируют, что в среде, содержащей ЭТС, ингибирование НАХР препятствует ФМА-индуцированному повышению митохондриального супероксида и приводит к значительному снижению уровня восстановленного глутатиона. Это свидетельствует о вовлеченности НАХР в образование митохондриального супероксида при ФМА-индуцированном стрессе и в поддержание уровня восстановленного глутатиона.

В бессывороточной среде ингибирование НАХР приводит к повышению активности СОД и каталазы, а также к росту уровня восстановленного глутатиона. Это позволяет заключить, что в отсутствие факторов сыворотки функциональная активность НАХР подавляет работу антиоксидантных ферментов СОД и каталазы, а также системы восстановления глутатиона.

Заклучение. Установлено, что вовлеченность nAХР в регуляцию окислительно-восстановительного баланса клеток глиомы С6 проявляется в их влиянии на генерацию митохондриального супероксида, активность антиоксидантных систем и уровень окислительного повреждения клеточных структур. Роль nAХР определяется наличием сывороточных факторов и условиями культивирования. В бессывороточной среде ингибитор nAХР альфа-кобротоксин противодействует окислительному стрессу, увеличивая активность супероксиддисмутазы и каталазы, уровень восстановленного глутатиона и уменьшая концентрацию малонового диальдегида.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (проект М16Р-171) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-54-00199).

Acknowledgements. This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (projects no. M16P-171) and by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-54-00199).

Список использованных источников

1. Nicotine mediates oxidative stress and apoptosis through cross talk between NOX1 and Bcl-2 in lung epithelial cells / F. Zanetti [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 76. – P. 173–184. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.002
2. Maternal nicotine exposure leads to higher liver oxidative stress and steatosis in adult rat offspring / E. P. Conceição [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – Vol. 78. – P. 52–59. DOI: 10.1016/j.fct.2015.01.025
3. Nicotine induces podocyte apoptosis through increasing oxidative stress / X. Lan [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, N 12. – P. e0167071. DOI: 10.1371/journal.pone.0167071
4. Niu, X.-M. Acetylcholine receptor pathway in lung cancer: new twists to an old story / X.-M. Niu, S. Lu // *World J. of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 667–676. DOI: 10.5306/wjco.v5.i4.667
5. Ion channels gated by acetylcholine by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery / Z. S. Wu [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2015. – Vol. 36, N 8. – P. 895–907. DOI: 10.1038/aps.2015.66
6. Nicotine exposure and the progression of chronic kidney disease: role of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor / G. Rezonzew [et al.] // *Amer. J. of Physiology-Renal Physiology*. – 2012. – Vol. 303, N 2. – P. F304–F312. DOI: 10.1152/ajprenal.00661.2011
7. Activation of nicotinic acetylcholine receptor prevents the production of reactive oxygen species in fibrillar β amyloid peptide (1-42)-stimulated microglia / J. H. Moon [et al.] // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 40, N 1. – P. 11–18. DOI: 10.3858/emm.2008.40.1.11
8. Acetylcholine and antibodies against the acetylcholine receptor protect neurons and astrocytes against beta-amyloid toxicity / A. V. Kamynina [et al.] // *Intern. J. of Biochemistry and Cell Biology*. – 2013. – Vol. 45, N 4. – P. 899–907. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.01.011
9. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease / Y. Liu [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2015. – Vol. 91. – P. 87–96. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.028
10. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture / Z. Han [et al.] // *J. of Neurochemistry*. – 2014. – Vol. 131, N 4. – P. 498–508. DOI: 10.1111/jnc.12817
11. Nirthanan, S. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on / S. Nirthanan, M. C. Gwee // *J. of Pharmacological Sciences*. – 2004. – Vol. 94, N 1. – P. 1–17. DOI: 10.1254/jphs.94.1
12. Wang, Z. F. Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury / Z. F. Wang, X. C. Tang // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581, N 4. – P. 596–602. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.016
13. Nirnanjan, R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6 / R. Nirnanjan, C. Nath, R. Shukla // *Free Radical Research*. – 2012. – Vol. 46, N 9. – P. 1167–1177. DOI: 10.3109/10715762.2012.697626
14. Dimeric α -cobratoxin X-ray structure: localization of intermolecular disulfides and possible mode of binding to nicotinic acetylcholine receptors / A. V. Osipov [et al.] // *J. of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – P. 6725–6734. DOI: 10.1074/jbc.M111.322313
15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк [и др.] // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
16. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // *Вопр. мед. химии*. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
17. Oxy-radical metabolism and control of tumour growth / T. Galeotti [et al.] // *Xenobiotica*. – 1991. – Vol. 21, N 8. – P. 1041–1051. DOI: 10.3109/00498259109039544
18. Разыграев, А. В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дителиоис (2-нитробензойной кислоты) / А. В. Разыграев А. В. Арутюнян // *Клин. лаб. диагностика*. – 2006. – № 6. – С. 13–16.
19. Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase Ca in C2C12 myocytes / Y. Wang [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2006. – Vol. 72, N 7. – P. 881–892. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.06.032

20. The protein kinase C inhibitor Aeb071 (sotrastaurin) modulates migration and superoxide anion production by human neutrophils *in vitro* / F. Capsoni [et al.] // Intern. J. of Immunopathology and Pharmacology. – 2012. – Vol. 25, N 3. – P. 617–626. DOI: 10.1177/039463201202500308
21. Nicotine-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells / C. S. Kim [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0152591. DOI: 10.1371/journal.pone.0152591
22. Steinberg, S. F. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C / S. F. Steinberg // Frontiers in Pharmacology. – 2015. – Vol. 6. – P. 128. DOI: 10.3389/fphar.2015.00128
23. Shen, J. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system / J. Shen, J. L. Yakel // Acta Pharmacologica Sinica. – 2009. – Vol. 30, N 6. – P. 673–680. DOI: 10.1038/aps.2009.64
24. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: implications in tumorigenesis and cancer progression / J. Krstić [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. – Vol. 2015. – 15 p. DOI: 10.1155/2015/654594
25. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress / A. Planavila [et al.] // Cardiovascular Research. – 2014. – Vol. 106, N 1. – P. 19–31. DOI: 10.1093/cvr/cvu263
26. Arda-Pirincci, P. The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats / P. Arda-Pirincci, S. Bolkent // Acta Histochemica. – 2014. – Vol. 116, N 1. – P. 167–175. DOI: 10.1016/j.acthis.2013.07.005
27. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification / V. I. Lushchak // Chemical-Biological Interactions. – 2014. – Vol. 224. – P. 164–175. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
28. *In vitro* effect of sodium fluoride on malondialdehyde concentration and on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in human erythrocytes / J. Gutiérrez-Salinas [et al.] // The Scientific World J. – 2013. – Vol. 2013. – 7 p. DOI: 10.1155/2013/864718

References

1. Zanetti F., Giacomello M., Donati Y., Carnesecchi S., Frieden M., Barazzone-Argiroffo C. Nicotine mediates oxidative stress and apoptosis through cross talk between NOX1 and Bcl-2 in lung epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, vol. 76, pp. 173–84. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.002
2. Conceição E. P., Peixoto-Silva N., Pinheiro C. R., Oliveira E., Moura E. G., Lisboa P. C. Maternal nicotine exposure leads to higher liver oxidative stress and steatosis in adult rat offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, vol. 78, pp. 52–59. DOI: 10.1016/j.fct.2015.01.025
3. Lan X., Lederman R., Eng J. M., Shoshitari S. S., Saleem M. A., Malhotra A., Singhal P. C. Nicotine induces podocyte apoptosis through increasing oxidative stress. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 12, p. e0167071. DOI: 10.1371/journal.pone.0167071
4. Niu X.-M., Lu S. Acetylcholine receptor pathway in lung cancer: new twists to an old story. *World Journal of Clinical Oncology*, 2014, vol. 5, no. 4, pp. 667–676. DOI: 10.5306/wjco.v5.i4.667
5. Wu Z. S., Cheng H., Jiang Y., Melcher K., Xu H. E. Ion channels gated by acetylcholine by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, vol. 36, no. 8, pp. 895–907. DOI: 10.1038/aps.2015.66
6. Rezonzew G., Chumley P., Feng W., Hua P., Siegal G. P., Jaimes E. A. Nicotine exposure and the progression of chronic kidney disease: role of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2012, vol. 303, no. 2, pp. F304–F312. DOI: 10.1152/ajprenal.00661.2011
7. Moon J. H., Kim S. Y., Lee H. G., Kim S. U., Lee Y. B. Activation of nicotinic acetylcholine receptor prevents the production of reactive oxygen species in fibrillar β amyloid peptide (1-42)-stimulated microglia. *Experimental and Molecular Medicine*, 2008, vol. 40, no. 1, pp. 11–18. DOI: 10.3858/emm.2008.40.1.11
8. Kamynina A. V., Holmstrom K. M., Korojev D. O., Volpina O. M., Abramov A. Y. Acetylcholine and antibodies against the acetylcholine receptor protect neurons and astrocytes against beta-amyloid toxicity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2013, vol. 45, no. 4, pp. 899–907. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.01.011
9. Liu Y., Zeng X., Hui Y., Zhu C., Wu J., Taylor D. H., Ji J., Fan W., Huang Z., Hu J. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 2015, vol. 91, pp. 87–96. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.028
10. Han Z., Li L., Wang L., Degos V., Maze M., Su H. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture. *Journal of Neurochemistry*, 2014, vol. 131, no. 4, pp. 498–508. DOI: 10.1111/jnc.12817
11. Nirthanan S., Gwee M. C. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2004, vol. 94, no. 1, pp. 1–17. DOI: 10.1254/jphs.94.1
12. Wang Z. F., Tang X. C. Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *FEBS Letters*, 2007, vol. 581, no. 4, pp. 596–602. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.016
13. Niranjana R., Nath C., Shukla R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6. *Free Radical Research*, 2012, vol. 46, no. 9, pp. 1167–1177. DOI: 10.3109/10715762.2012.697626
14. Osipov A. V., Rucktooa P., Kasheverov I. E., Filkin S. Y., Starkov V. G., Andreeva T. V., Sixma T. K., Bertrand D., Utkin Y. N., Tsetlin V. I. Dimeric α -cobratoxin X-ray structure: localization of intermolecular disulfides and possible mode of binding to nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, pp. 6725–6734. DOI: 10.1074/jbc.M111.322313

15. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Maiorova I. G., Tokarev V. E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoye delo* [Laboratory Work], 1988, no. 1, pp. 16–19 (in Russian).
16. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Questions of Medical Chemistry], 1990, vol. 36, no. 2, pp. 88–91 (in Russian).
17. Galeotti T., Masotti L., Borrello S., Casali E. Oxy-radical metabolism and control of tumour growth. *Xenobiotica*, 1991, vol. 21, no. 8, pp. 1041–1051. DOI: 10.3109/00498259109039544
18. Razygraev A. V., Arutyunyan A. V. Determination of human serum glutathione peroxidase activity, by using hydrogen peroxide and 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Russian Clinical Laboratory Diagnostics], 2006, no. 6, pp. 13–16 (in Russian).
19. Wang Y., Biswas G., Prabu S. K., Avadhani N. G. Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase C α in C2C12 myocytes. *Biochemical Pharmacology*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 881–892. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.06.032
20. Capsoni F., Ongari A. M., Reali E., Bosè F., Altomare G. F. The protein kinase C inhibitor Aeb071 (sotrastaurin) modulates migration and superoxide anion production by human neutrophils *in vitro*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2012, vol. 25, no. 3, pp. 617–626. DOI: 10.1177/039463201202500308
21. Kim C. S., Choi J. S., Joo S. Y., Bae E. H., Ma S. K., Lee J., Kim S. W. Nicotine-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 3, p. e0152591. DOI: 10.1371/journal.pone.0152591
22. Steinberg S. F. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. *Frontiers in Pharmacology*, 2015, vol. 6, p. 128. DOI: 10.3389/fphar.2015.00128
23. Shen J., Yakel J. L. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 673–680. DOI: 10.1038/aps.2009.64
24. Krstić J., Trivanović D., Mojsilović S., Santibanez J. F. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, vol. 2015, p. 15. DOI: 10.1155/2015/654594
25. Planavila A., Redondo-Angulo I., Ribas F., Garrabou G., Casademont J., Giral M., Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research*, 2014, vol. 106, no. 1, pp. 19–31. DOI: 10.1093/cvr/cvu263
26. Arda-Pirincci P., Bolkent S. The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Histochemica*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 167–175. DOI: 10.1016/j.acthis.2013.07.005
27. Lushchak V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, vol. 224, pp. 164–175. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
28. Gutiérrez-Salinas J., García-Ortiz L., Morales González J. A., Hernández-Rodríguez S., Ramírez-García S., Núñez-Ramos N. R., Madrigal-Santillán E. *In vitro* effect of sodium fluoride on malondialdehyde concentration and on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in human erythrocytes. *Scientific World Journal*, 2013, vol. 2013, p. 7. DOI: 10.1155/2013/864718

Информация об авторах

Терпинская Татьяна Ильинична – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: terpinskayat@mail.ru.

Осипов Алексей Валерьевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: osipov-av@ya.ru.

Кондрашова Светлана Болеславовна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Svetlana.condraschova2011@yandex.ru.

Улащик Владимир Сергеевич – академик, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Уткин Юрий Николаевич – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: yutkin@yandex.ru; utkin@mx.ibch.ru.

Information about the authors

Tatiana I. Terpinskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: terpinskayat@mail.ru.

Alexey V. Osipov – Ph. D. (Chem.), Senior researcher. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (16/10, Miklouho-Maclai Str., 117997, Moscow, Russian Federation). E-mail: osipov-av@ya.ru.

Svetlana B. Kondrashova – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Svetlana.condraschova2011@yandex.ru.

Vladimir S. Ulashchik – Academician, D. Sc. (Med.), Professor, Chief researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Yuri N. Utkin – D. Sc. (Chem.), Professor, Chief researcher. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (16/10, Miklouho-Maclai Str., 117997, Moscow, Russian Federation). E-mail: yutkin@yandex.ru; utkin@mx.ibch.ru.