

Новичкова Мария Дмитриевна

**ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ И ГЛУТАРЕДОКСИНЫ В РЕДОКС-
ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» г. Москва

Научный руководитель:

**Калинина
Елена Валентиновна** доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т. Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Официальные оппоненты:

**Посыпанова
Галина Ароновна** доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Киямова
Рамзия Галлямовна** доктор биологических наук, старший научный сотрудник, и.о. заведующего кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Защита состоится «5» декабря 2018 г. в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.39 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «___»_____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.39
кандидат биологических наук

О.Б. Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность темы исследования.

Редокс-зависимые механизмы лежат в основе регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Редокс-гомеостаз поддерживают ферментные системы, регуляция действия которых осуществляется через редокс-зависимый сигналинг. При недостаточном уровне антиоксидантной защиты активные формы кислорода (АФК) приводят к развитию окислительного стресса, вызывающего повреждение молекул липидов, белков и нуклеиновых кислот, нарушение функциональной способности клетки, что приводит к ее гибели. Вследствие этого окислительный стресс служит одной из причин развития многочисленных патологических состояний, в том числе онкологических заболеваний [Sies H. et al., 2017].

Из систем, поддерживающих внутриклеточный редокс-гомеостаз, основными являются соотношения восстановленных и окисленных форм НАД, тиоредоксина и глутатиона [Go Y.-M., Jones D.P., 2008], среди которых лидирующее положение занимает соотношение GSH/GSSG вследствие наиболее высокой внутриклеточной концентрации этого трипептида. В связи с этим, в последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов контроля соотношения GSH/GSSG, рассматриваемого в качестве главного показателя клеточного редокс-статуса, а также эффективности действия GSH-зависимых ферментов, в первую очередь, глутатионтрансферазы и глутаредоксина, принимающих активное участие как в антиоксидантной защите, так и в процессах тиол-дисульфидного обмена, связанных с редокс-зависимой регуляцией функциональной активности белков и ферментов [Shen D.W. et al., 2012; Galluzzi L. et al., 2014; Fra A. et al., 2017].

В настоящее время активно исследуется роль редокс-зависимых процессов в развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток [Кuo M.T., 2009; Cort A. et al., 2016; Davalli P. et al., 2018], которая значительно снижает эффективность химиотерапии онкологических больных. Природа формирования лекарственной устойчивости носит многофакторный характер, и наиболее известные механизмы её развития представляют собой инактивацию лекарственных средств, снижение поступления лекарств в клетку за счет ускорения их обратного транспорта из клетки, амплификацию молекул-мишеней цитостатиков, подавление систем клеточной гибели [Norouzi-Barough L. et al., 2018]. Однако вклад редокс-зависимых ферментных систем, поддерживающих и регулирующих клеточный редокс-гомеостаз, в развитие устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам, обладающим прооксидантным действием, все еще остается малоизученным.

Широко используемый в онкологической практике противоопухолевый препарат цисплатин находится в одном ряду с препаратами, для которых эффективность использования в терапии ограничена развитием лекарственной устойчивости опухолей [Achkar I.W. et al., 2018]. Цисплатин обладает прооксидантным действием, в связи с чем актуальным становится исследование роли изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина в редокс-зависимых процессах формирования устойчивости опухолевых клеток к цисплатину.

Степень разработанности темы.

Первоначально цисплатин рассматривался как алкилирующий агент [Fichtinger-Schepman A.M.J. et al.; 1985; Eastman A., 1986], однако в настоящее время установлена его способность активировать генерацию активных форм кислорода [Bratasz A. et al., 2006; Berndtsson M. et al., 2007; Rubera I. et al., 2013; Filippova M. et al., 2014; Yuan Y. et al., 2015; Quintanilha J.C.F. et al., 2017]. В то же время, роль редокс-зависимых механизмов в

развитии устойчивости злокачественных новообразований к действию этого противоопухолевого препарата остается малоизученной.

Несмотря на известную роль глутатиона и глутатионтрансферазы в детоксикации цисплатина [Goto S. et al., 1999; Peklak-Scott C. et al., 2008], не изучен вклад изоформ глутатионтрансферазы, участвующих в антиоксидантной защите [Dusinska M. et al., 2001; Desmots F. et al., 2002; Belzacq A. S. et al., 2003; Manevich Y. et al., 2004; Breton C. V. et al., 2007], в редокс-зависимые процессы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину. Глутаредоксин, как тиоловая оксидоредуктаза, катализирует процессы восстановления дисульфидов и деглутатионилирования и участвует в редокс-зависимой регуляции клеточного сигналинга [Anathy V. et al., 2009; Gallogly M.M. et al., 2009; Stroher E. et al., 2012; Allen E.M.G. et al., 2012; Hanschmann E.M. et al., 2013; Liu X.B., 2015], однако не изучена его роль в развитии резистентности опухолевых клеток к прооксидантному действию цисплатина.

Цель исследования. Изучить роль изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина в редокс-зависимых процессах формирования лекарственной устойчивости ряда опухолевых клеток к цисплатину.

Задачи исследования:

- определить соотношение GSH/GSSG, установить характер экспрессии генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* и восстановления его из окисленной формы, оценить активность этих ферментов при развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток человека эритролейкемии K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 к цисплатину;
- установить характер экспрессии генов редокс-зависимых изоформ глутатионтрансферазы GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1, GSTK1-1 и оценить активность GST при развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину;
- установить характер экспрессии генов изоформ глутаредоксина Grx1 и Grx2 и оценить активность Grx при развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину;
- оценить содержание редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2 в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках;
- оценить роль глутатион-зависимых процессов в редокс-регуляции апоптоза у опухолевых клеток, чувствительных и резистентных к цисплатину.

Научная новизна. Впервые показано, что формирование устойчивости опухолевых клеток человека эритролейкемии K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 к широко используемому в химиотерапии онкологических заболеваний противоопухолевому препарату цисплатину сопровождается ростом экспрессии генов изоформ глутатионтрансферазы GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1, GSTK1-1, а также изоформ глутаредоксина Grx1, Grx2, играющих значительную роль в системе антиоксидантной защиты, редокс-зависимом сигналинге и антиапоптотических механизмах, что можно расценивать как важную часть адаптивного антиоксидантного ответа на окислительный стресс, вызываемый ростом концентрации цисплатина, обладающего прооксидантным действием. Установлено, что повышение индекса клеточного редокс-статуса – соотношения GSH/GSSG, в резистентных клетках обусловлено скоординированным ростом экспрессии генов γ -GCSL, γ -GCSH, GSS, что создает оптимальные условия для синтеза GSH *de novo* и указывает на усиление роли GSH-зависимых процессов при формировании резистентности к цисплатину. Впервые показано, что скоординированный рост экспрессии генов изоформ GST и Grx (*hGSTP1*, *hGSTA4*, *GLRX1*, *GLRX2*), а также генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* (γ -GCSH, γ -GCSL, GSS, *Gt*) в резистентных клетках может объясняться повышением

внутриклеточного содержания редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2. Установлено, что сохранение высокого уровня соотношения GSH/GSSG и активностей GST и Grx способствуют защите резистентных клеток от индуцированного окислительным стрессом апоптоза при действии как H₂O₂, так и цисплатина, что сопровождается отсутствием или низким ростом АФК и отсутствием изменения соотношений Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты работы значительно расширяют фундаментальные представления о механизмах развития лекарственной резистентности опухолевых клеток, показывая важный вклад изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина в развитие адаптивного антиоксидантного ответа как редокс-зависимого пути формирования устойчивости к противоопухолевым препаратам, обладающим прооксидантным действием. Полученные данные могут быть использованы для создания новых схем химиотерапии с учетом установленной роли изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина.

Методология и методы диссертационного исследования.

При выполнении работы в методологическом плане использован ряд современных экспериментальных методов: МТТ-тест для оценки жизнеспособности клеток, определение содержания белка методом Бредфорда, оценка экспрессии генов с помощью метода ОТ-ПЦР, определение уровня белков методом Вестерн-блоттинга, оценка апоптоза методом проточной цитофлуориметрии с помощью окрашивания клеток пропидий иодидом и аннексином V, спектрофотометрические методы для определения активности ферментов, флуоресцентный метод для определения уровня образования супероксид-анион радикала. Оценка статистической значимости различий проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка результатов проводилась с применением программных пакетов Statistica 10, BioStat.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При формировании резистентности к цитотоксическому препарату цисплатину, обладающему прооксидантными свойствами, в клетках человека эритролейкемии K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 наблюдается скоординированное изменение экспрессии генов ключевых ферментов синтеза глутатиона *de novo* и ферментов глутатион-зависимой системы, обладающих антиоксидантными свойствами и участвующими в тиол-дисульфидном обмене, - изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина, что свидетельствует о важном вкладе этих ферментов в развитие адаптивного антиоксидантного ответа в резистентных клетках.
2. Резистентные к цисплатину клетки характеризуются ростом уровня соотношения GSH/GSSG (показателя клеточного редокс-статуса) за счет повышения внутриклеточного содержания GSH, что обеспечивается скоординированным ростом экспрессии генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* - каталитической (γ -GCSH), регуляторной (γ -GCSL) субъединиц γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтетазы (GSS). В резистентных клетках K562/CDDP и MCF-7/CDDP этот эффект усиливается повышением экспрессии гена γ -глутамилтрансферазы (Gt).
3. Формирование резистентности к цисплатину сопровождается ростом экспрессии генов изоформ глутатионтрансферазы, обладающих антиоксидантными и детоксицирующими свойствами: *hGSTP1*, *hGSTA4*, *hGSTT1*, *hGSTM1* и *hGSTK1*. Уровень экспрессии генов *hGSTM1* и *hGSTK1* не изменяется в клетках MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP, соответственно.
4. Для резистентных клеток K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP характерно повышение экспрессии генов митохондриальной и цитозольной изоформ глутаредоксина (Grx1 и Grx2) наряду с высоким уровнем активности Grx по отношению к смешанным дисульфидам.

5. Скоординированный рост экспрессии генов изоформ GST и Grx (*hGSTP1*, *hGSTA4*, *GLRX1*, *GLRX2*), а также генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* (γ -GCSH, γ -GCSL, GSS, Gt) может объясняться повышением внутриклеточного содержания редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2 в резистентных клетках.

6. У резистентных клеток K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP, в отличие от чувствительных, действие как H₂O₂, так и цисплатина при выбранных концентрациях не приводит к активации апоптотической гибели клеток и характеризуется отсутствием или низким ростом АФК, сохранением соотношений Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax, чему способствует высокий уровень соотношения GSH/GSSG и активностей GST и Grx.

Степень достоверности результатов работы.

Выводы, представленные в данной работе, подтверждаются экспериментальными данными. Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны и статистически достоверны.

Апробация результатов работы.

Результаты диссертационного исследования были представлены на 9 Международной Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2013), XXII Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Крым, Украина, 2014), XVI международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2014), 8 национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014), 5th Asia Pacific ISSX Meeting (Tianjin, China, 2014), 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Vienna, 2015), IX Международной конференции "Биоантиоксидант" (Москва, 2015), Седьмой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» – Молодежного симпозиума «Медико-биологические и экологические аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2015), Annual Meeting of Society for Free Radical Research-Europe (SFRR-E) 2016 (Budapest, Hungary, 2016), Международных конференциях и дискуссионных научных клубах «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, Россия, Крым, 2016, 2017), V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России (Сочи–Дагомыс, 2016), Oxygen Club of California (OCC) World Congress and Annual SFRR-E Conference 2017: Metabolic Stress and Redox Regulation (Berlin, Germany, 2017).

Личное участие автора.

Личный вклад автора состоял в подготовке образцов, проведении биохимических экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных. Автор участвовал в подготовке публикаций по материалам исследований. Автором лично проведены научно-информационный поиск, анализ и обобщение литературных данных, формулирование положений и выводов при написании диссертационной работы.

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликованы 19 работ, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях из Перечня ВАК.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т. Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и используются при подготовке лекционного курса «Медицинская энзимология» для студентов III курса, обучающихся по специальности «Лечебное дело».

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста. Она включает введение, обзор литературы, описания материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы, 17 таблиц и 25 рисунков. Список литературы содержит 397 ссылок (24 отечественных и 373 зарубежных).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использованы клеточные линии человека: эритролейкемии K562 (Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург), аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 (ОАО Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва). K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S – чувствительные к цисплатину линии клеток с IC_{50} – 6,0, 13,0, 2,7 мкМ, соответственно; K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP – резистентные к цисплатину клеточные линии с IC_{50} – 12,7, 30,0, 12,0 мкМ, соответственно. Клетки K562 культивировали суспензионно в среде RPMI 1640 («Sigma-Aldrich», США), клетки MCF-7 и SKOV-3 – в виде монослоя в среде DMEM («Sigma-Aldrich», США) во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37 °С при добавлении в культуральные среды 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («GibcoBRL», США), 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина. Резистентность клеток к цисплатину получена путем ступенчатого повышения концентрации цитостатика в культуральной среде. Для исследований были использованы клеточные культуры в логарифмической фазе роста.

Для оценки пролиферативной активности и выживаемости клеток использовали МТТ-тест [Mosmann T., 1985].

Определение содержания общего глутатиона (GSH + GSSG) проводили спектрофотометрически с использованием реактива Элмана в присутствии глутатионредуктазы. Количество окисленного глутатиона оценивали после предварительного связывания GSH с 2-винилпиридином [Tietze F., 1969].

Количество белка в клеточных лизатах определяли методом Бредфорда [Bradford M.M., 1976].

Активности ферментов определялись спектрофотометрически:

- γ -глутамилцистеинсинтетазы – по скорости окисления НАДН в ходе проведении нескольких сопряженных ферментативных реакций с участием пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [Richman P.G. and Meister A., 1975];
- γ -глутамилтрансферазы – по скорости образования *n*-нитроанилина из L- γ -глутамил-*n*-нитроанилида, [Tate S.S. et al., 1985];
- глутатионредуктазы – по скорости окисления НАДФН с восстановлением субстрата GSSG до GSH [Carlberg I. et al., 1975];
- глутатионтрансферазы – по скорости образования конъюгатов GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом, этакриновой кислотой и 4-гидрокси-2,3-ноненалем [Habig W.H. et al., 1974];
- глутаредоксина – по скорости окисления НАДФН при восстановлении β -гидроксиэтилдисульфида в присутствии GSH [Holmgren A. et al., 1995].

Оценку экспрессии генов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Оцениваемый уровень мРНК рассчитывали относительно мРНК β -актина.

Внутриклеточное содержание белков определяли с использованием метода Вестерн-блоттинга [Towbin H. et al., 1979] с использованием моноклональных антител к Bcl-2 (Bcl-2-100, Sigma), Bcl-xL (2H12, Sigma), β -актину (AC-40, Sigma) и

поликлональные антитела к Nrf-2 (H-300, Santa Cruse). Относительное содержание исследуемого белка оценивали по данным денситометрии, используя в качестве контрольного белка β -актин.

Анализ клеточной гибели проводили методом проточной цитофлуориметрии по анализу клеток, окрашенных пропидий иодидом и аннексином V, конъюгированным флуорохромом FITC (AnnV-FITC).

Для определения уровня образования супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) использовали флуоресцентный метод [Benov L. et al., 1998].

Оценка статистической значимости различий проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка результатов проводилась с применением программных пакетов Statistica 10, BioStat. Статистическую значимость различий средних оценивали t-критерием Стьюдента [Гланц С., 1998].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка экспрессии генов и активности изоформ GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1 и GSTK1-1 в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Результаты проделанной работы показали, что развитие резистентности опухолевых клеток K562/S, MCF-7/S и SKOV-3 к цисплатину, обладающему прооксидантным действием, связано с изменением экспрессии генов редокс-зависимых изоформ GST, вносящих существенный вклад в клеточную антиоксидантную защиту – GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1, GSTK1-1.

Оценка активности GST по отношению к 1-хлор-2,4-динитробензолу (универсальному субстрату для всех изоформ GST) позволила обнаружить ее значительное повышение во всех типах резистентных клеток: в клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP – в 2,5, 2,8 и 2 раза, соответственно (таблица 1). Отмечен также рост активности по отношению к этакриновой кислоте (субстрату, специфичному для изоформы GSTP1-1): в 1,7, 2,5 и 1,4 раза, соответственно. Рост экспрессии гена *hGSTP1* обнаружен во всех резистентных клетках (рис. 1, а, г). Установлено, что по сравнению с чувствительными клетками уровень мРНК GSTP1-1 в клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP был выше в 2, 2,8 и 1,3 раза, соответственно. Следует отметить, что GSTP1-1 участвует в инактивации продуктов окисления ДНК и липидов, в том числе пропеналей азотистых оснований и акролеина, по отношению к которым GSTP1-1 обладает высокой специфичностью [Berhane K. et al., 1994].

Рост экспрессии гена *hGSTA4* обнаружен у всех исследуемых сублиний резистентных клеток (рис. 1, б, д). В клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP рост уровня мРНК GSTA4-4 был практически одинаковым и превышал таковой в чувствительных клетках в 2,8, 2,8 и 2,5 раза, соответственно. Оценка активности GST по отношению к 4-гидрокси-2,3-ноненали (специфичному субстрату для изоформы GSTA4-4), продукту перекисного окисления липидов, способному вызывать деструктивную модификацию белков и ДНК и активацию апоптоза [Desmots F. et al., 2002], позволила установить её рост в 1,9, 1,8 и 1,8 раза, соответственно (таблица 1).

Во всех трех линиях резистентных к цисплатину опухолевых клеток обнаружен рост экспрессии гена изоформы GSTT1-1 (рис. 1, в, е), которая способна предотвращать окисления пиримидиновых оснований в ДНК [Dusinska M. et al., 2001]. В клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP уровень мРНК GSTT1-1 превышал таковой в чувствительных клетках в 2, 2,4 и 2,9 раза, соответственно.

Таблица 1. Активность глутатионтрансферазы при формировании резистентности опухолевых клеток к цисплатину

Субстрат Тип клеток	Активность GST, нмоль/мин×мг белка		
	1-хлор-2,4-динитробензол	этакриновая кислота	4-гидрокси-2,3-ноненаль
K562/S	13,6 ± 0,6	3,51 ± 0,42	1,62 ± 0,54
K562/CDDP	34,1 ± 1,0***	6,02 ± 0,48*	3,08 ± 0,21*
MCF7/S	6,9 ± 0,6	2,14 ± 0,92	2,73 ± 0,27
MCF7/CDDP	19,3 ± 0,8***	5,35 ± 0,42*	4,91 ± 0,57*
SKOV-3/S	16,3 ± 1,7	4,12 ± 0,26	0,99 ± 0,18
SKOV-3/CDDP	32,6 ± 1,3***	5,77 ± 0,42*	1,58 ± 0,16*

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность различий с показателями для клеток чувствительных к цисплатину сублиний; $n = 7$.

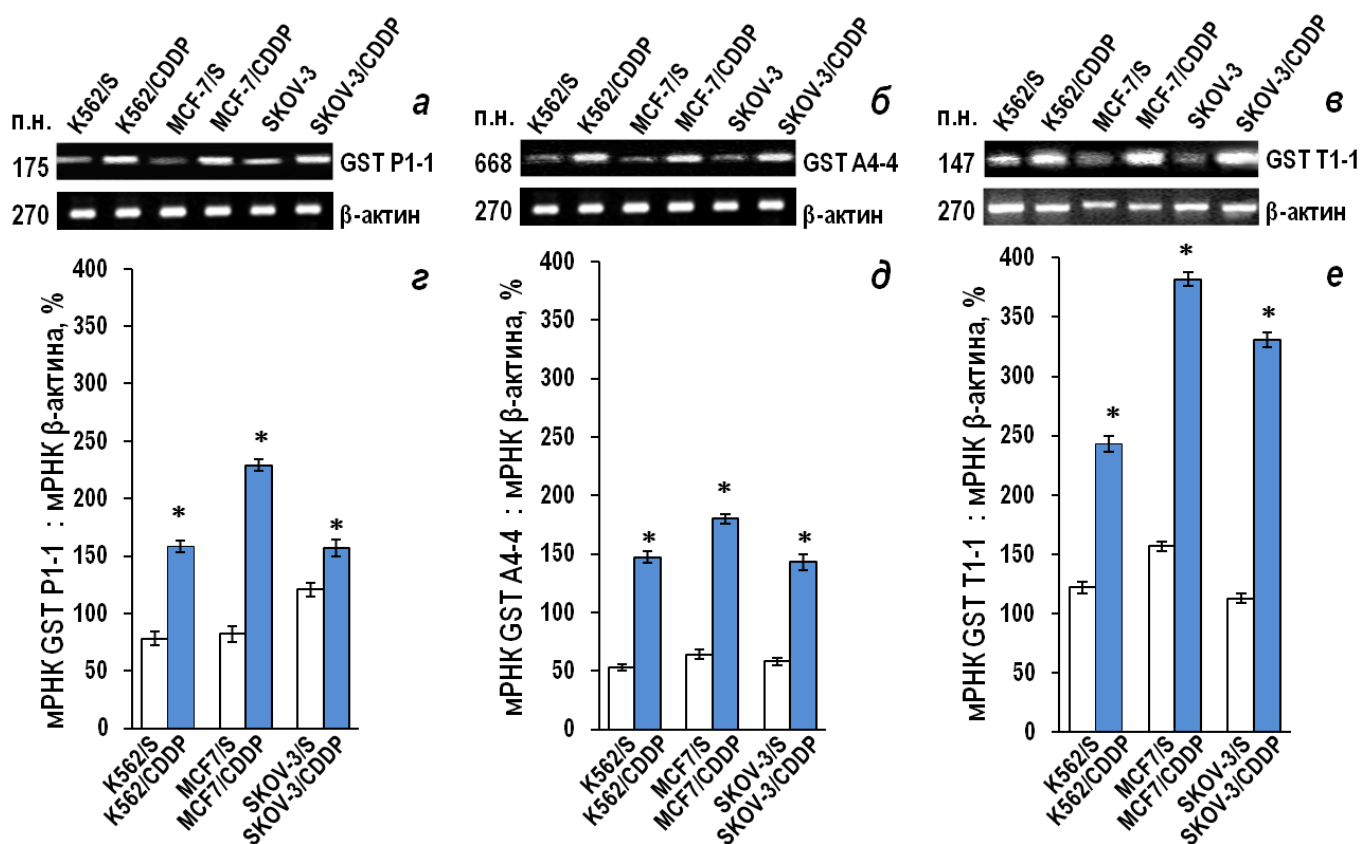


Рисунок 1. ОТ-ПЦР-анализ мРНК GSTP1-1 (а, г), GSTA4-4 (б, д) и GSTT1-1 (в, е) в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках линий K562, MCF-7 и SKOV-3. а, б, в – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; г, д, е – оценка уровня мРНК GSTP1-1, GSTA4-4 и GSTT1-1 с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β -актина использован в качестве положительного контроля; $n = 4$ (* $p < 0,05$).

Повышение экспрессии гена *hGSTM1* установлено в клетках K562/CDDP и SKOV-3/CDDP (рис. 2, а, в). При этом более высокий рост уровня мРНК *GSTM1-1* отмечен в клетках K562/CDDP (в 2 раза). *GSTM1-1* выступает в качестве ловушки свободных радикалов и тормозит окисление молекул ДНК, защищая от появления 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина [Breton C. V. et al, 2007]. Кроме того, наряду с GSTP1-1 для *GSTM1-1* отмечено участие в антиапоптотических механизмах регуляции клеточного сигналинга

посредством инактивации MAP-киназ – ASK1 и JNK1 в результате белок-белкового взаимодействия [Hayes J. D. et al, 2005].

Митохондриальная изоформа GSTK1-1 обладает пероксидазной активностью по отношению к органическим гидроперекисям [Morel F. et al., 2011]. В клетках K562/CDDP и MCF-7/CDDP установлено повышение экспрессии гена *hGSTK1*. В этих клетках обнаружен одинаковый (в 2,6 раза) рост уровня мРНК GSTK1-1 (рис. 2, б, г).

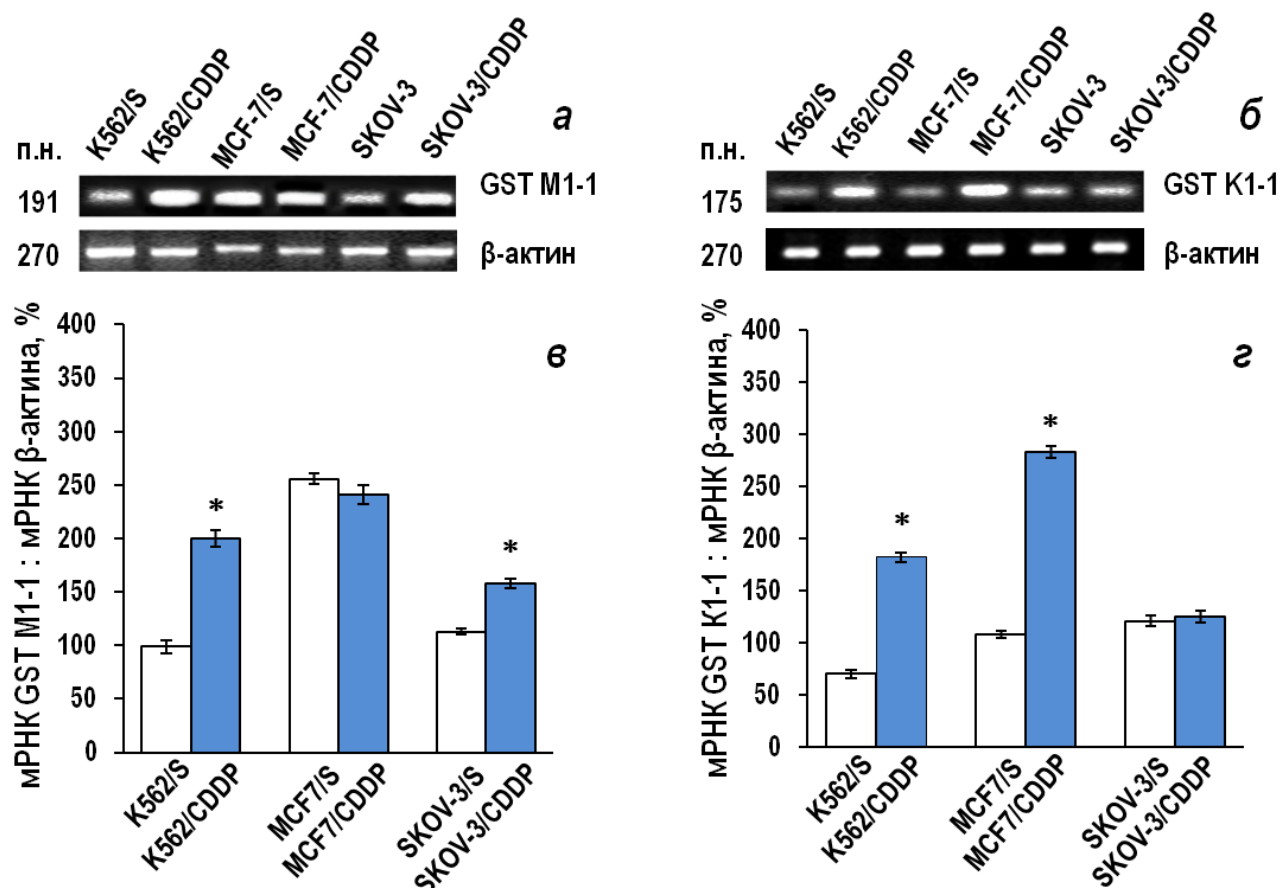


Рисунок 2. ОТ-ПЦР-анализ мРНК GSTM1-1 (а, в) и GSTK1-1 (б, г) в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках линий K562, MCF-7 и SKOV-3. а, б – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; в, г – оценка уровня мРНК GSTM1-1 и GSTK1-1 с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β-актина использован в качестве положительного контроля; n = 4 (*p < 0,05).

Оценка экспрессии генов изоформ Grx1 и Grx2 и активности глутаредоксина в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Нами проанализирован характер экспрессии генов двух изоформ тиоловой оксидоредуктазы глутаредоксина (Grx): цитозольной Grx1 и митохондриальной Grx2 в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках. Оценка экспрессии гена *GLRX1* в резистентных к цисплатину клетках показала ее значительный рост во всех трех клеточных сублиниях (рис. 3, а, в). Максимальное повышение уровня мРНК изоформы Grx1 (в 6,5 раза) обнаружено в резистентных клетках K562/CDDP, более низкий – в клетках MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP (в 4,0 и 2,6 раза, соответственно). Восстанавливая дисульфиды, изоформа Grx1 играет важную роль в тиол-дисульфидном обмене [Holmgren A., 1989], благодаря чему участвует в клеточной дифференцировке [Takashima Y. et al., 1999], регуляции активности транскрипционных факторов [Bandyopadhyay S. et al., 1998] и процесса апоптоза.

Установлено, что развитие резистентности к цисплатину вызывает значительный рост в экспрессии гена изоформы Grx2: в клетках K562/CDDP уровень мРНК Grx2 вырос в 6 раз, тогда как в клетках MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP – в 4 раза (рис. 3, б, г). Катализируя обратимое S-глутатионирование митохондриального комплекса I, функциональная активность которого сопровождается образованием O_2^- , Grx2 регулирует уровень АФК в митохондриях [Beer S.M. et al., 2004]. Также, за счет белок-белкового взаимодействия Grx1 может инактивировать ASK1 [Song J.J. et al., 2002].

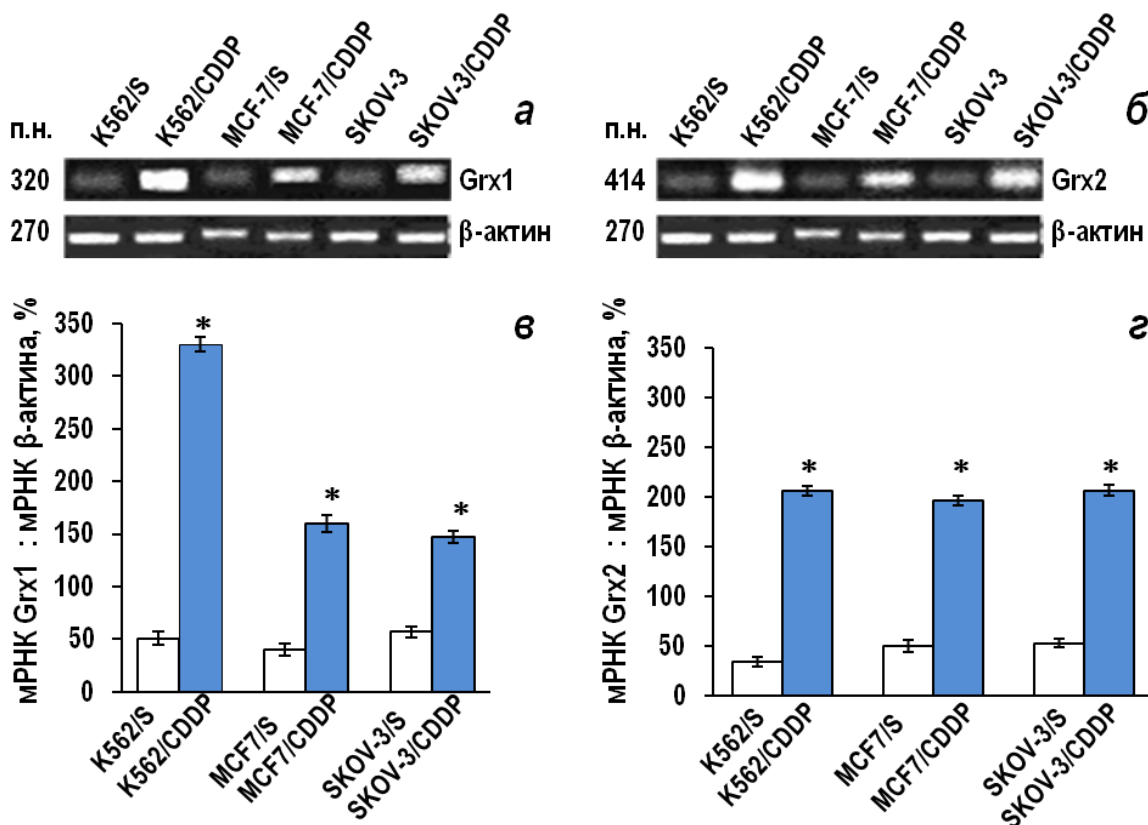


Рисунок 3. ОТ-ПЦР-анализ мРНК Grx1 (а, в) и Grx2 (б, г) в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках линий K562, MCF-7 и SKOV-3. а, б – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; в, г – оценка уровня мРНК Grx1 и Grx2 с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β-актина использован в качестве положительного контроля; n = 4 (*p < 0,05).

Повышение активности Grx обнаружено во всех трех типах резистентных клеток по сравнению с чувствительными: наибольший рост активности обнаружен у клеток K562/CDDP – в 4 раза, в меньшей степени – у клеток MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP (в 3 и 1,8 раза, соответственно) (таблица 2).

Таблица 2. Активность глутаредоксина при формировании резистентности опухолевых клеток к цисплатину

Линия клеток	Активность Grx, нмоль/мин×мг белка		
	K562	MCF-7	SKOV-3
чувствительные к цисплатину	0,51 ± 0,09	0,82 ± 0,12	0,50 ± 0,06
резистентные к цисплатину	2,10 ± 0,32**	2,46 ± 0,20**	0,90 ± 0,16*

* p < 0,01, **p < 0,001 – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии; n = 4.

Оценка экспрессии гена глутатионредуктазы и генов γ -глутамилцистеинсинтетазы, глутатионсинтетазы – ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* в чувствительных и устойчивых к цисплатину опухолевых клетках

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в клетке обеспечивается за счет его синтеза *de novo* благодаря работе γ -глутамильного цикла и восстановления из окисленной формы (GSN) за счет активности глутатионредуктазы. Ключевыми ферментами γ -глутамильного цикла являются γ -глутамилцистеинсинтетаза (γ -GCS) и глутатионсинтетаза (GS), катализирующие образование γ -глутамилцистеина и его последующее превращение в глутатион, соответственно.

Значимого различия в уровне экспрессии гена и каталитической активности глутатионредуктазы во всех трех резистентных клеточных сублиниях по сравнению с чувствительными обнаружено не было (данные не приводятся).

Однако при формировании устойчивости к цисплатину в трех опухолевых линиях клеток K562, MCF7 и SKOV-3 отмечается рост уровня мРНК как тяжелой (каталитической), так и легкой (регуляторной) субъединиц γ -GCS – скорость-лимитирующего фермента в синтезе GSH *de novo* (рис. 4). В резистентных клеточных сублиниях K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP установлен рост уровней мРНК γ -GCSL (в 1,6, 1,6 и 2,7 раза) и мРНК γ -GCSH (в 2,9, 1,5 и 2,4 раза) по отношению к чувствительным клеткам, соответственно. Оценка каталитической активности γ -GCS позволила установить ее повышение в устойчивых клетках по сравнению с чувствительными в 2,0, 1,5 и 1,6 раза для линий клеток K562, MCF7 и SKOV-3, соответственно (таблица 3).

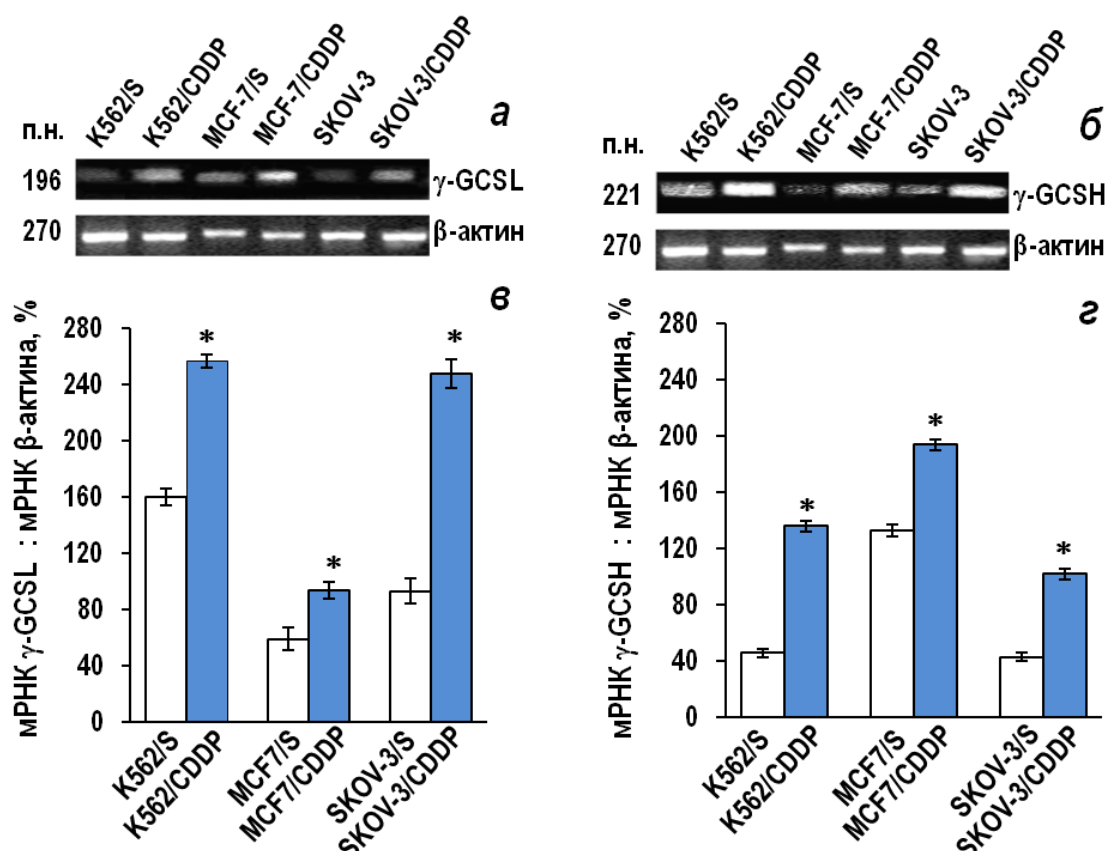


Рисунок 4. ОТ-ПЦР-анализ мРНК γ -GCSL (а, в) и γ -GCSH (б, г) субъединиц γ -GCS в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках K562, MCF-7 и SKOV-3. а, б – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; в, г – оценка уровня мРНК γ -GCSL и γ -GCSH с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β -актина использован в качестве положительного контроля; n = 4 (*p < 0,05).

Таблица 3. Активность γ -глутамилцистеинсинтетазы при формировании резистентности опухолевых клеток к цисплатину

		Активность γ -GCS, нмоль/мин×мг белка		
		К562	MCF-7	SKOV-3
Тип клеток	Линия клеток			
	чувствительные к цисплатину	121 ± 21	48 ± 8	109 ± 22
резистентные к цисплатину		242 ± 38*	72 ± 5*	174 ± 16*

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии, $n = 4$.

В резистентных клетках наблюдался рост уровня мРНК для другого фермента, связанного с синтезом GSH *de novo* – GS: отмечено повышение мРНК GS для клеточных линий K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP в сравнении с чувствительными в 3,8, 1,8 и 1,9 раза, соответственно (рис. 5).

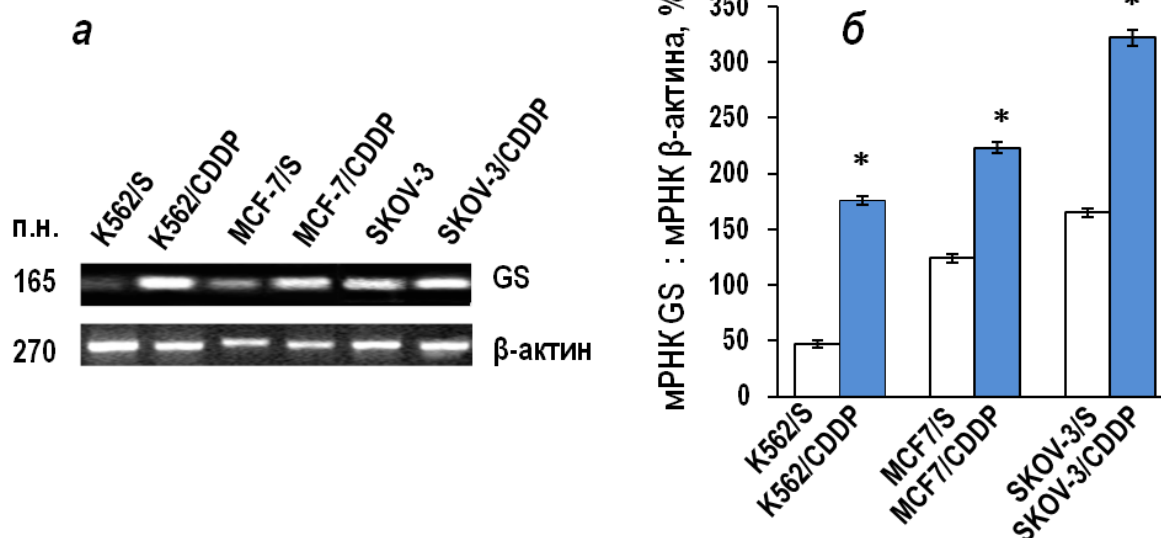


Рисунок 5. ОТ-ПЦР-анализ мРНК GS в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках K562, MCF-7 и SKOV-3. а – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; б – оценка уровня мРНК GS с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β -актина использован в качестве положительного контроля; $n = 4$ (* $p < 0,05$).

Повышение экспрессии генов γ -GCSL, γ -GCSH и GSS – ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* – происходит скоординировано при развитии у опухолевых клеток устойчивости к цисплатину, но степень изменения экспрессии различна для разных типов клеток.

Оценка экспрессии гена и активности γ -глутамилтрансферазы в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Функционирование γ -глутамильного цикла и, соответственно, синтез GSH *de novo* в большой степени зависят от активности γ -глутамилтрансферазы (γ -GT), которая обеспечивает расщепление специфической связи γ -глутамильного остатка в молекуле экстраклеточного глутатиона и транспорт в клетку γ -глутамильных групп, а также способствует пополнению извне пула цистеина [Lu S.C., 2013].

Оценка уровня мРНК γ -GT в устойчивых к цисплатину опухолевых клетках в сравнении с чувствительными позволила установить его повышение в 3,9 раза для клеток K562 и 3,6 раза для клеток MCF7, тогда как у клеток SKOV-3 значимого изменения экспрессии гена *Gt* не было отмечено (рис. 6).

Аналогичная картина прослеживается и для активности фермента: для резистентных клеток K562/CDDP и MCF-7/CDDP наблюдается рост каталитической активности γ -GT (в 2 и 1,9 раза, соответственно), что не отмечается в клетках SKOV-3/CDDP (таблица 4).

Таблица 4. Активность γ -глутамилтрансферазы при формировании резистентности опухолевых клеток к цисплатину

Линия клеток		Активность γ -GT, нмоль/мин×мг белка		
		K562	MCF-7	SKOV-3
чувствительные к цисплатину		10,9 ± 1,2	2,4 ± 0,4	8,1 ± 1,0
резистентные к цисплатину		21,8 ± 2,4*	4,6 ± 0,7*	8,2 ± 1,4

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии, $n = 4$.

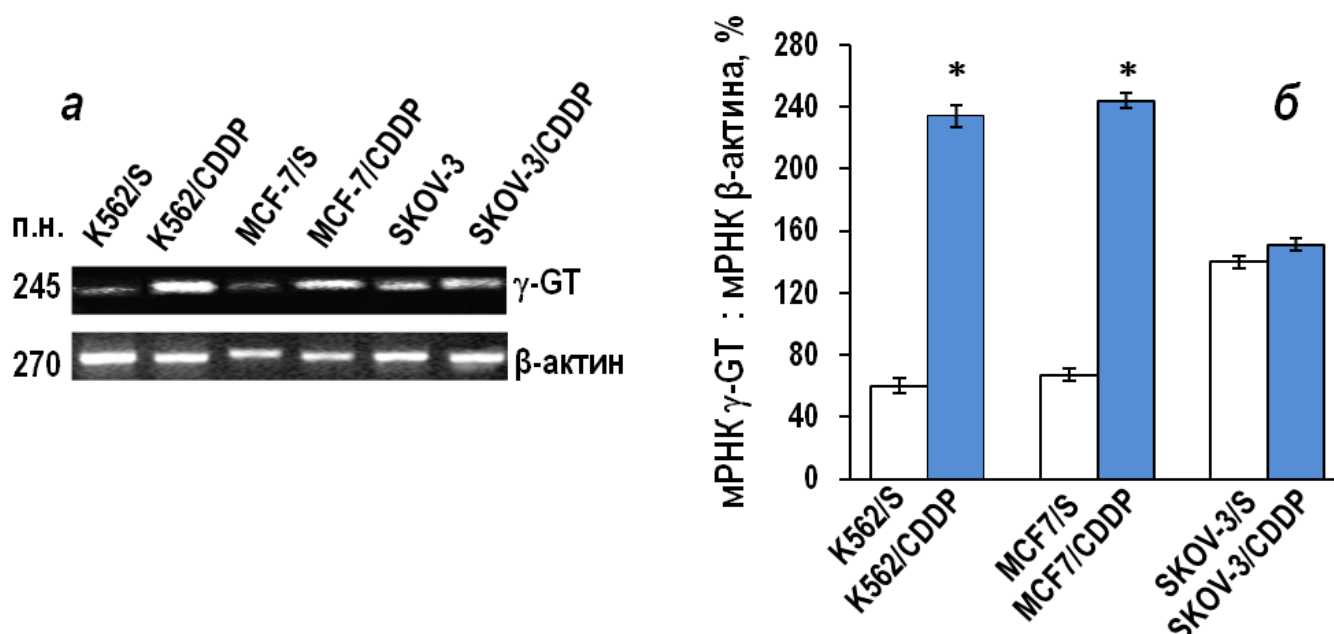


Рисунок 6. ОТ-ПЦР-анализ мРНК γ -GT в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках K562, MCF-7 и SKOV-3. а – электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР; б – оценка уровня мРНК γ -GT с использованием данных денситометрии. Уровень мРНК β -актина использован в качестве положительного контроля; $n = 4$ (* $p < 0,05$).

Оценка содержания восстановленного и окисленного глутатиона в опухолевых клетках, чувствительных и резистентных к цисплатину. Анализ изменения отношения GSH к GSSG как основного показателя в формировании окислительно-восстановительного статуса клетки

Соотношение восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG рассматривается в качестве главного показателя клеточного редокс-статуса и важнейшего фактора в контроле клеточного редокс-зависимого сигналинга, а также и эффективности GSH-зависимых ферментов, в частности глутатионтрансферазы и глутаредоксина.

Оценка уровня GSH в опухолевых клетках позволила установить, что при формировании лекарственной устойчивости к цисплатину, наблюдалось повышение этого показателя во всех трех клеточных линиях K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP (в 1,5, 1,5, 1,6 раза, соответственно) по сравнению с клетками дикого типа (таблица 5).

Таблица 5. Содержание GSH и GSSG в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Сублинии клеток	GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH/GSSG	<u>GSH/GSSG рез. клетки</u> GSH/GSSG чув. клетки
K562/S	37,2 ± 5,2	0,65 ± 0,07	57 ± 5	2,0
K562/CDDP	55,8 ± 2,9*	0,50 ± 0,08	112 ± 8**	
MCF7/S	27,1 ± 3,2	0,87 ± 0,09	31 ± 3	1,7
MCF7/CDDP	40,6 ± 2,6*	0,77 ± 0,05	53 ± 6*	
SKOV-3/S	11,4 ± 2,1	0,75 ± 0,06	15 ± 3	1,8
SKOV-3/CDDP	18,6 ± 1,1*	0,69 ± 0,07	27 ± 3*	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверность различий с показателями для клеток, чувствительных к цисплатину, $n = 4$.

Достоверно значимого изменения уровня GSSG при сравнении чувствительных и резистентных клеток установлено не было ($p > 0,05$). Рост соотношения GSH/GSSG в резистентных клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP составил в 2,0, 1,7 и 1,8 раза, соответственно, что свидетельствует о росте клеточного редокс-статуса, индексом которого является соотношение GSH/GSSG, и доминировании восстановительных процессов при формировании резистентности к цисплатину.

Оценка транскрипционного фактора Nrf2 в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

При оценке относительного содержания белка Nrf2 с помощью метода Вестерн-блоттинга нами установлено, что в резистентных клетках наблюдается повышение его внутриклеточного уровня в 3,2, 2,7 и 2,2 раза в клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP, соответственно по сравнению с чувствительными клетками (рис. 7).

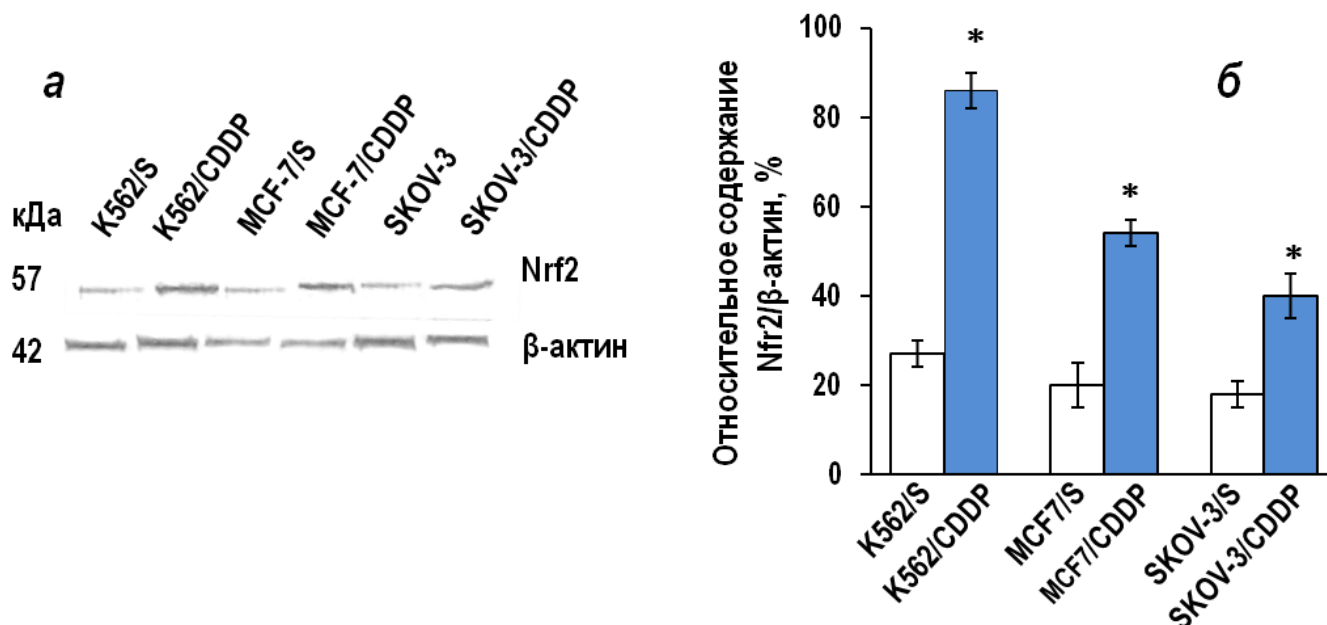


Рисунок 7. Вестерн-блоттинг анализ внутриклеточного уровня Nrf2 в чувствительных (K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S) и резистентных к цисплатину (K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP) клетках. а – иммуноблот Nrf2, в качестве положительного контроля использован β -актин; б – оценка уровня Nrf2 по отношению к β -актину с использованием данных денситометрии ($n = 4$); * $p < 0,05$.

Таким образом, скоординированный рост экспрессии генов изоформ GST и Grx (*hGSTP1*, *hGSTA4*, *GLRX1*, *GLRX2*), а также генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* (γ -GCSH, γ -GCSL, *GSS*, *Gt*) в резистентных опухолевых клетках при формировании резистентности к прооксиданту цисплатину может быть связан с активацией редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2, отвечающего за экспрессию генов ряда антиоксидантных ферментов, среди которых присутствуют указанные гены [Ляхович В.В. и др., 2006; Huang Y. et al., 2015; Liu X. B. et al., 2016].

Оценка активности глутатионтрансферазы и глутаредоксина, соотношений GSH/GSSG, Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax, уровня активных форм кислорода у чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клеток при активации апоптоза действием перекиси водорода

Анализ апоптотической гибели клеток в условиях развития окислительного стресса проводился после действия раствора перекиси водорода. Чувствительные и резистентные клетки линий K562, MCF-7, SKOV-3 инкубировали в течение 24 часов с 0,1 мкМ H₂O₂.

Действие перекиси водорода вызывало рост апоптотической гибели у чувствительных клеток K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S в 2,6, 7,5 и 3,1 раза, соответственно, по сравнению со спонтанным уровнем апоптоза, тогда как у резистентных – K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP количество апоптотических клеток практически не отличалось от спонтанного уровня (рис. 8). У чувствительных клеток отмечено значительное повышение числа событий поздней апоптотической гибели после инкубации H₂O₂.

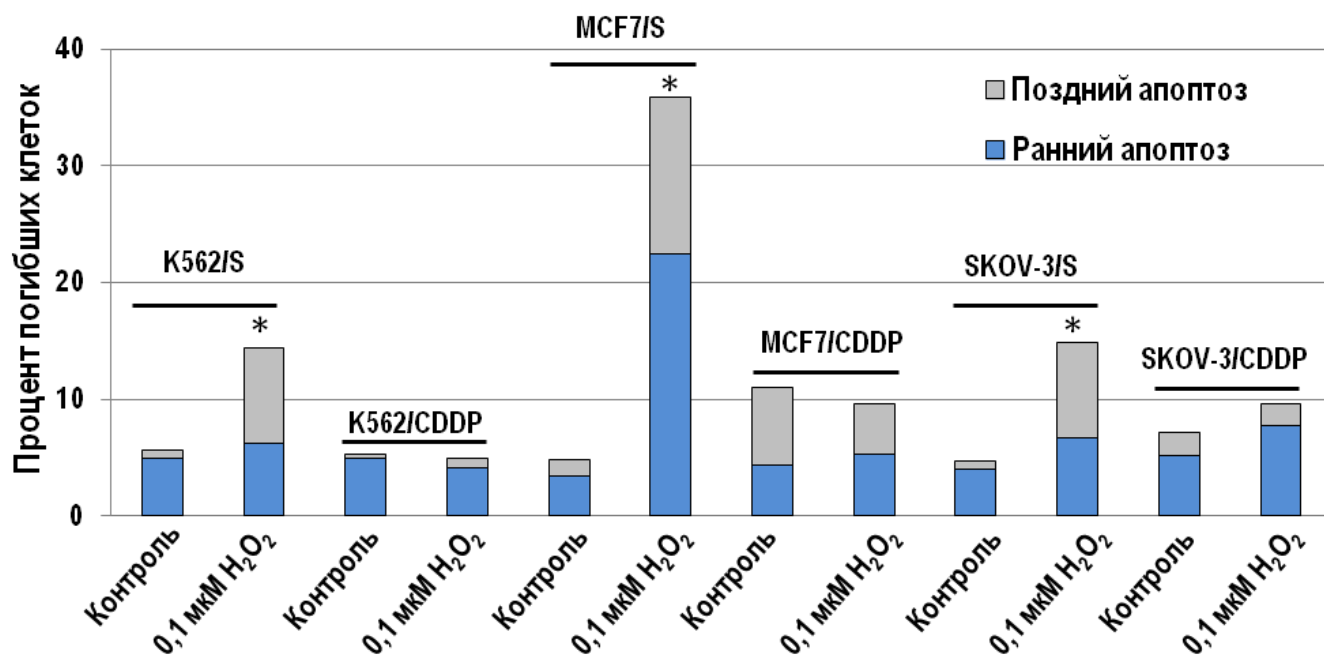


Рисунок 8. Распределение опухолевых клеток, чувствительных и резистентных к цисплатину, по типам программируемой клеточной гибели до и после действия H₂O₂; n = 4 (*p < 0,05).

При оценке влияния H₂O₂ на уровень АФК (оценивался уровень продукции O₂^{•-}) обнаружен его рост в клетках дикого типа: в 1,8, 3,5, и 1,5 раза в клетках K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S, соответственно (рис. 9). В резистентных клетках K562/CDDP и SKOV-3/CDDP при действии перекиси водорода не отмечено достоверно значимого (p > 0,05) изменения уровня АФК. В резистентных клетках MCF-7/CDDP уровень АФК повышался 2,5 раза, однако в меньшей степени, чем в чувствительных клетках MCF-7/S (в 3,5 раза) (рис. 9, б).

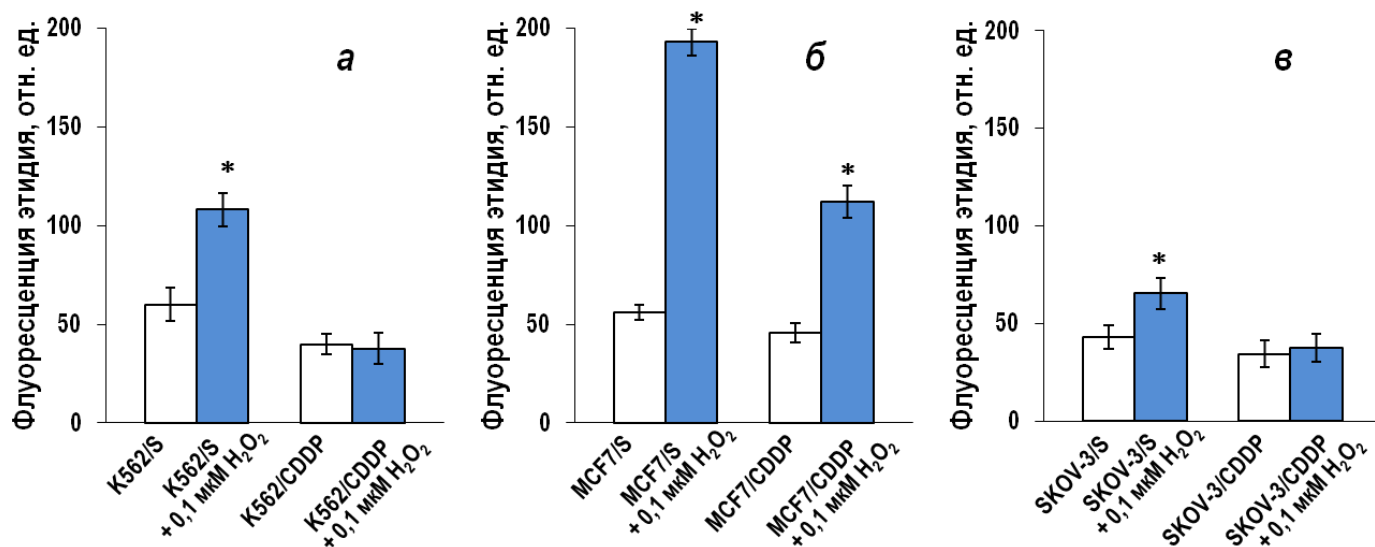


Рисунок 9. Влияние перекиси водорода на уровень активных форм кислорода в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках: а – K562/S, K562/CDDP; б – MCF-7/S, MCF-7/CDDP; в – SKOV-3/S, SKOV-3/CDDP; n = 4 (*p < 0,05).

Проведена оценка внутриклеточного уровня ключевых белков семейства Bcl-2, обладающих антиапоптотическими (Bcl-2 и Bcl-xl) и проапоптотическими свойствами (Bax), методом Вестерн-блоттинга и последующего денситометрирования в чувствительных и резистентных клетках до и после действия перекиси водорода. В резистентных клетках по сравнению с чувствительными установлен более высокий внутриклеточный уровень белков Bcl-2 и Bcl-xl. Инкубация клеток дикого типа с H₂O₂ приводила к заметному снижению уровня Bcl-2, Bcl-xl и росту содержания Bax. В клетках K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S обнаружено снижение соотношения Bcl-2/Bax (в 4,0, 8,3 и 4,3 раза, соответственно) и Bcl-xl/Bax (в 3,7, 6,4 и 6,0, соответственно) (таблица 6). Напротив, действие H₂O₂ не вызывало в резистентных клетках изменения внутриклеточного содержания этих белков и соотношений Bcl-2/Bax, Bcl-xl/Bax.

После инкубации с H₂O₂ наблюдалось заметное снижение соотношения GSH/GSSG в клетках дикого типа K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S в 1,5, 2,2, и 1,5 раза, соответственно (таблица 7). В резистентных к цисплатину клетках K562/CDDP и SKOV-3/CDDP действие H₂O₂ не вызвало достоверно значимого (p > 0,05) изменения GSH/GSSG. В резистентных клетках MCF-7/CDDP значение GSH/GSSG снижалось (в 1,6 раза), однако в меньшей степени, чем в чувствительных клетках (в 2,2 раза).

Таблица 6. Влияние перекиси водорода на отношения Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Линия и тип клеток	Bcl-2/Bax		Bcl-xl/Bax	
	До инкубации	После инкубации	До инкубации	После инкубации
K562/S	2,0 ± 0,4	0,5 ± 0,2*	2,2 ± 0,4	0,6 ± 0,2*
K562/CDDP	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,9	3,7 ± 0,8	3,6 ± 0,6
MCF-7/S	3,3 ± 0,4	0,4 ± 0,2*	3,2 ± 0,6	0,5 ± 0,2*
MCF-7/CDDP	3,7 ± 0,8	3,0 ± 0,6	3,6 ± 0,8	3,0 ± 0,5
SKOV-3/S	3,0 ± 0,8	0,7 ± 0,2*	3,0 ± 0,4	0,5 ± 0,2*
SKOV-3/CDDP	6,4 ± 0,6	6,2 ± 0,6	7,0 ± 0,9	7,0 ± 0,6

* p < 0,05 – достоверность различий с данными, полученными до инкубации с H₂O₂, n = 4.

Таблица 7. Влияние перекиси водорода на соотношение GSH/GSSG в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Линия и тип клеток	GSH/GSSG	
	До инкубации	После инкубации
K562/S	57 ± 5	38 ± 8*
K562/CDDP	112 ± 8	110 ± 6
MCF7/S	31 ± 3	14 ± 8*
MCF7/CDDP	53 ± 6	33 ± 3*
SKOV-3/S	15 ± 3	10 ± 2*
SKOV-3/CDDP	27 ± 3	26 ± 4

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными, полученными до инкубации с H_2O_2 , $n = 4$.

Действие перекиси водорода вызывало снижение активности глутатионтрансферазы в клетках дикого типа трех исследуемых линий (таблица 8). Так, в клетках K562, MCF-7, SKOV-3 наблюдалось снижение ферментативной активности по отношению к универсальному субстрату для всех изоформ GST – 1-хлор-2,4-динитробензолу (в 1,7, 1,9, 1,8 раза, соответственно), по отношению к селективному субстрату для изоформы GSTP1-1 – этакриновой кислоте (в 1,8, 2,1, 1,9 раза, соответственно), по отношению к селективному субстрату для изоформы GSTA4-4 – 4-гидрокси-2,3-ноненали (в 1,8, 2,3 и 1,7, соответственно). В то же время не установлено достоверно значимых изменений активности GST в резистентных клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP, SKOV-3/CDDP.

Таблица 8. Активность глутатионтрансферазы до и после действия перекиси водорода на опухолевые клетки, чувствительные и резистентные к цисплатину

Субстрат Тип клеток	Активность GST, нмоль/мин×мг белка					
	1-хлор-2,4-динитробензол		этакриновая кислота		4-гидрокси-2,3-ноненаль	
	до	после	до	после	до	после
K562/S	10,5 ± 0,5	6,2 ± 0,9**	2,70 ± 0,32	1,51 ± 0,24*	1,25 ± 0,15	0,69 ± 0,11*
K562/CDDP	26,2 ± 0,8	25,4 ± 1,4	4,63 ± 0,37	4,55 ± 0,28	2,37 ± 0,16	2,42 ± 0,11
MCF7/S	5,3 ± 0,4	2,8 ± 0,2**	1,65 ± 0,17	0,79 ± 0,14**	2,11 ± 0,21	0,92 ± 0,14**
MCF7/CDDP	14,8 ± 0,6	11,4 ± 0,2	4,11 ± 0,32	2,94 ± 0,21	3,79 ± 0,41	2,71 ± 0,33
SKOV-3/S	12,5 ± 1,3	6,9 ± 0,7***	3,17 ± 0,21	1,67 ± 0,11***	0,76 ± 0,05	0,45 ± 0,09*
SKOV-3/CDDP	25,1 ± 1,1	23,8 ± 1,5	4,75 ± 0,31	4,52 ± 0,23	1,29 ± 0,12	1,27 ± 0,17

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность различий с показателями до действия 0,1 мкМ перекиси водорода, $n = 4$.

Аналогичный характер влияния перекиси водорода наблюдался в отношении активности Gtx: снижение активности установлено в чувствительных клетках (в 1,8, 2,4 и 1,7 раза в клетках K562, MCF-7 и SKOV-3, соответственно), тогда как в устойчивых к цисплатину клетках она не изменялась (таблица 9).

Таблица 9. Активность глутаредоксина до и после действия перекиси водорода на опухолевые клетки, чувствительные и резистентные к цисплатину

		Активность Grx, нмоль/мин×мг белка					
Линия клеток		K562		MCF7		SKOV-3	
Тип клеток		до	после	до	после	до	после
чувствительные к CDDP		0,42 ± 0,06	0,23 ± 0,03*	0,71 ± 0,11	0,30 ± 0,12*	0,39 ± 0,03	0,23 ± 0,03**
устойчивые к CDDP		1,79 ± 0,24	1,73 ± 0,28	2,19 ± 0,15	2,09 ± 0,18	0,76 ± 0,12	0,69 ± 0,14

*p < 0,05, **p < 0,01 – достоверность различий с показателями до действия 0,1 мкМ перекиси водорода, n = 4.

Оценка активности глутатионтрансферазы и глутаредоксина, соотношений GSH/GSSG, Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax, уровня активных форм кислорода у чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клеток при активации апоптоза действием цисплатина

После инкубации чувствительных клеток K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S (в течение 24 часов с 1, 2,5 и 0,5 мкМ цисплатина, соответственно) в чувствительных клетках наблюдался рост уровня апоптотической гибели (в 4, 2,3 и 3,4 раза, соответственно) по сравнению со спонтанным уровнем апоптоза. Напротив, в резистентных клетках не наблюдалось активации апоптоза (рис. 10). У чувствительных клеток число событий поздней апоптотической гибели повышалось после инкубации с цисплатином.

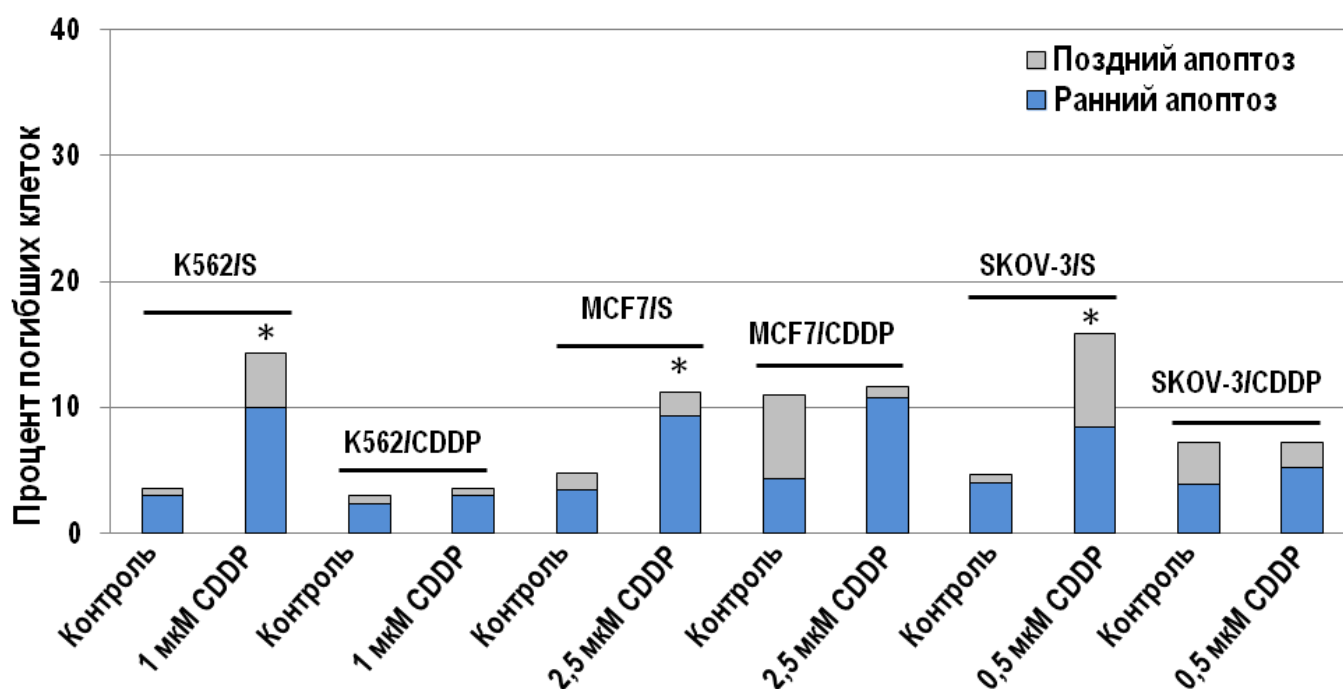


Рисунок 10. Распределение опухолевых клеток, чувствительных и резистентных к цисплатину, по типам программируемой клеточной гибели до и после действия цисплатина; n = 4 (*p < 0,05).

При оценке влияния цисплатина на уровень АФК обнаружен его рост в клетках K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S (в 1,6, 2,5, и 1,6 раза, соответственно) (рис. 11). Напротив, в резистентных клетках K562/CDDP и SKOV-3/CDDP не отмечено достоверно значимого ($p > 0,05$) изменения уровня АФК. В резистентных клетках MCF-7/CDDP установлено повышение уровня АФК (в 1,7 раза), однако в меньше степени, чем в чувствительных клетках MCF-7 (в 2,5 раза).

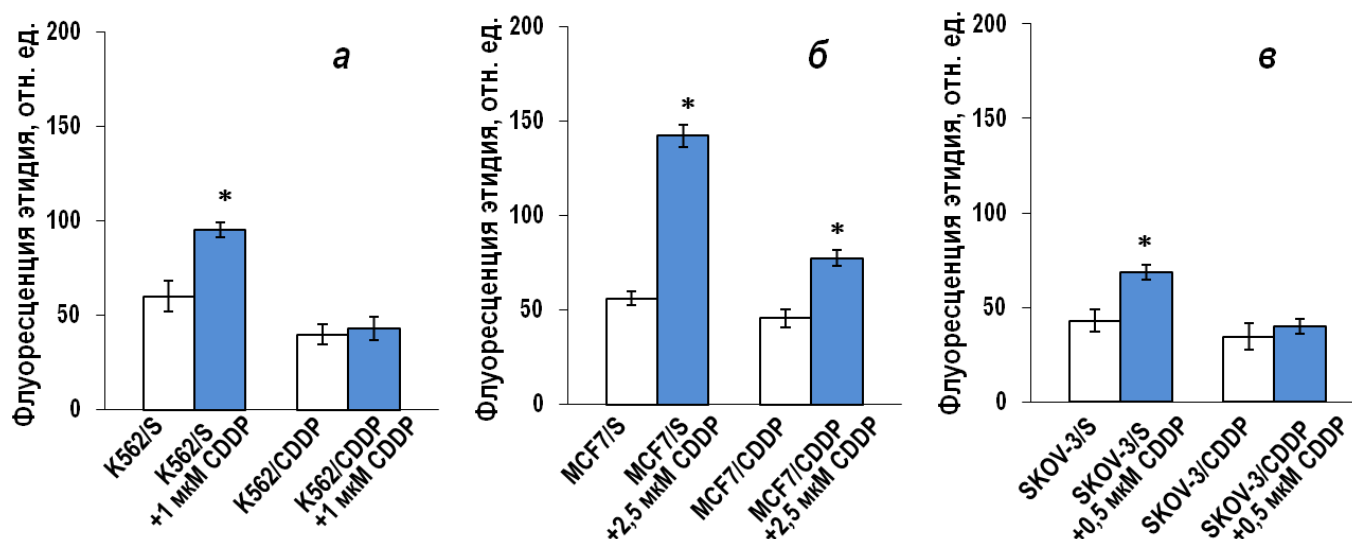


Рисунок 11. Влияние цисплатина на уровень активных форм кислорода в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках: а – K562/S, K562/CDDP; б – MCF-7/S, MCF-7/CDDP; в – SKOV-3/S, SKOV-3/CDDP; n = 4 (* $p < 0,05$).

Оценка внутриклеточного уровня белков Bcl-2, Bcl-xl и Вах методом Вестерн-блоттинга позволила установить, что инкубация клеток дикого типа K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S с цисплатином приводит к заметному снижению уровня Bcl-2, Bcl-xl и росту уровня Вах. Напротив, в резистентных клетках практически не отмечалось изменения внутриклеточного содержания этих белков, тогда как изначально резистентные клетки обладали более высоким в сравнении с чувствительными клетками уровнями Bcl-2 и Bcl-xl. Установлено, что инкубация с цисплатином вызывает снижение соотношения Bcl-2/Вах в чувствительных клетках K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S: в 3,7, 5,5 и 6,0 раза, соответственно (таблица 10), тогда как в резистентных клетках это соотношение практически не менялось. Соотношение Bcl-xl/Вах также снижалось в чувствительных клетках: в 5,5, 5,0 и 8 раз в клетках K562/S, MCF-7/S, SKOV-3/S, соответственно. Напротив, в резистентных клетках не обнаружено изменения этого соотношения.

Таблица 10. Влияние цисплатина на отношения Bcl-2/Вах и Bcl-xl/Вах в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Линия и тип клеток	Bcl-2/Вах		Bcl-xl/Вах	
	До инкубации	После инкубации	До инкубации	После инкубации
K562/S	2,2 ± 0,6	0,6 ± 0,3*	2,2 ± 0,8	0,4 ± 0,2*
K562/CDDP	4,0 ± 0,9	3,8 ± 1,1	2,7 ± 0,8	2,6 ± 0,6
MCF-7/S	3,3 ± 0,8	0,6 ± 0,2*	3,0 ± 0,8	0,6 ± 0,2*
MCF-7/CDDP	4,0 ± 0,9	3,9 ± 0,6	4,0 ± 1,2	3,9 ± 0,7
SKOV-3/S	3,0 ± 0,7	0,5 ± 0,3*	3,2 ± 0,9	0,4 ± 0,2*
SKOV-3/CDDP	6,8 ± 0,7	7,0 ± 0,8	7,2 ± 1,4	7,0 ± 1,2

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными, полученными до инкубации с CDDP, n = 4.

После инкубации с цисплатином в клетках K562/S, MCF-7/S и SKOV-3/S установлено снижение соотношения GSH/GSSG (1,5, 2,4, и 1,5 раза, соответственно) (таблица 11). В резистентных клетках K562/CDDP и SKOV-3/CDDP не было отмечено достоверно значимого ($p > 0,05$) изменения GSH/GSSG. В то же время в резистентных клетках MCF-7/CDDP значение GSH/GSSG оказалось сниженным в 1,6 раза, однако в меньшей степени, чем в чувствительных клетках MCF-7/S (в 2,4 раза).

Таблица 11. Влияние цисплатина на отношение GSH/GSSG в чувствительных и резистентных к цисплатину опухолевых клетках

Линия и тип клеток	GSH/GSSG	
	До инкубации	После инкубации
K562/S	57 ± 5	38 ± 8*
K562/CDDP	112 ± 5	100 ± 6
MCF7/S	31 ± 3	13 ± 8*
MCF7/CDDP	53 ± 6	34 ± 8*
SKOV-3/S	15 ± 3	10 ± 2*
SKOV-3/CDDP	27 ± 4	26 ± 6

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными, полученными до инкубации с CDDP, $n = 4$.

Действие цисплатина приводило к снижению активности GST в чувствительных K562, MCF-7 и SKOV-3 клетках по отношению к 4-гидрокси-2,3-ноненали – специфичному субстрату для изоформы GSTA4-4 (в 1,6, 1,8, 1,6 раза, соответственно) (таблица 12), к этакриновой кислоте – специфичному субстрату для изоформы GSTP1-1 (в 1,5, 1,6 и 1,5 раза, соответственно) и к универсальному субстрату для всех изоформ GST – 1-хлор-2,4-динитробензолу (в 1,5, 1,6 и 1,5 раза, соответственно). В то же время активность GST в резистентных клетках практически не изменялась.

Оценка активности глутаредоксина показала ее снижение в чувствительных клетках K562, MCF-7 и SKOV-3 (в 1,6, 1,8 и 1,5 раза, соответственно) и отсутствие изменений в устойчивых клетках (таблица 13).

Таблица 12. Активность глутатионтрансферазы до и после действия цисплатина на чувствительные и резистентные опухолевые клетки

Субстрат Тип клеток	Активность GST, нмоль/мин×мг белка					
	1-хлор-2,4-динитробензол		этакриновая кислота		4-гидрокси-2,3-ноненаль	
	до	после	до	после	до	после
K562/S	9,1 ± 0,4	6,1 ± 0,11*	2,34 ± 0,28	1,56 ± 0,11*	1,16 ± 0,08	0,72 ± 0,12*
K562/CDDP	22,7 ± 0,7	21,6 ± 0,8	4,01 ± 0,33	3,89 ± 0,45	2,20 ± 0,15	2,15 ± 0,27
MCF7/S	4,6 ± 0,4	2,9 ± 0,3*	1,43 ± 0,17	0,89 ± 0,08*	1,82 ± 0,31	1,01 ± 0,10*
MCF7/CDDP	12,9 ± 0,5	10,9 ± 0,7	3,57 ± 0,28	3,68 ± 0,35	3,27 ± 0,38	3,05 ± 0,25
SKOV-3/S	10,9 ± 1,1	7,3 ± 0,3*	2,94 ± 0,19	1,96 ± 0,34*	0,71 ± 0,09	0,44 ± 0,05*
SKOV-3/CDDP	21,7 ± 0,9	22,4 ± 1,7	4,12 ± 0,30	4,01 ± 0,45	1,22 ± 0,11	1,15 ± 0,19

* $p < 0,05$ – достоверность различий с показателями до действия CDDP (1, 2,5 и 0,5 мкМ CDDP для чувствительных и устойчивых клеток K562, MCF-7, SKOV-3, соответственно), $n = 4$.

Таблица 13. Активность глутаредоксина до и после действия цисплатина на чувствительные и резистентные опухолевые клетки

		Активность Grx, нмоль/мин×мг белка					
Линия клеток Тип клеток	K562		MCF7		SKOV-3		
	до	после	до	после	до	после	
чувствительные к CDDP	0,59 ± 0,04	0,37 ± 0,02**	0,67 ± 0,09	0,37 ± 0,03*	0,38 ± 0,05	0,25 ± 0,01*	
устойчивые к CDDP	2,13 ± 0,19	2,41 ± 0,26	2,14 ± 0,15	2,07 ± 0,07	0,69 ± 0,07	0,70 ± 0,11	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – достоверность различий с показателями до действия CDDP (1, 2,5 и 0,5 мкМ CDDP для чувствительных и устойчивых клеток K562, MCF-7, SKOV-3, соответственно), $n = 4$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящем диссертационном исследовании, позволяют сделать следующие выводы:

1. В опухолевых клетках K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP, резистентных к цитостатику цисплатину, обладающему прооксидантным действием, обнаружено скоординированное повышение экспрессии генов ключевых ферментов синтеза глутатиона *de novo* и ферментов глутатион-зависимой системы, участвующих в антиоксидантной защите и в тиол-дисульфидном обмене, а именно изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина, что свидетельствует о важном вкладе этих ферментов в развитие адаптивного антиоксидантного ответа в резистентных клетках.
2. Повышение внутриклеточного содержания GSH и соотношения GSH/GSSG у резистентных к цисплатину клеток K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP связано со скоординированным ростом экспрессии генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* – γ -глутамилцистеинсинтетазы (каталитической и регуляторной субъединиц) и глутатионсинтетазы. В резистентных клетках K562/CDDP и MCF-7/CDDP этот эффект усиливается повышением экспрессии гена γ -глутамилтрансферазы.
3. Формирование резистентности к цисплатину сопровождается ростом экспрессии генов изоформ глутатионтрансферазы, обладающих антиоксидантными и детоксицирующими свойствами: *hGSTP1*, *hGSTA4*, *hGSTT1*, *hGSTM1*, *hGSTK1*. Уровень экспрессии генов *hGSTM1* и *hGSTK1* не изменяется в клетках MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP, соответственно.
4. В резистентных клетках установлен рост экспрессии генов изоформ глутаредоксина Grx1 и Grx2 наряду с высоким уровнем активности Grx по отношению к смешанным дисульфидам.
5. Формирование резистентности опухолевых клеток к цисплатину сопровождается повышением внутриклеточного содержания редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2.

6. У резистентных клеток K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP, в отличие от чувствительных клеток, действие как H₂O₂, так и цисплатина (при выбранных концентрациях) не приводит к активации апоптотической гибели клеток и характеризуется отсутствием или низким ростом АФК, отсутствием изменения соотношений Bcl-2/Bax и Bcl-xl/Bax, чему способствует сохранение высокого уровня активностей глутатионтрансферазы и глутаредоксина и величины соотношения GSH/GSSG.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Саприн А.Н., Калинина Е.В., **Бабенко М.Д.** Биохимические механизмы развития и регуляции мультилекарственной резистентности раковых клеток // Успехи биологической химии. – 1996. – Т. 36. – С. 213-265.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р., **Новичкова М.Д.**, Саприн А.Н., Березов Т.Т. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатион-зависимых ферментов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 3. – С. 46-54.
3. Kalinina E.V., Berezov T.T., Shtil A.A., Chernov N.N., Glazunova V.A., **Novichkova M.D.**, Nurmuradov N.K. Expression of Genes of Glutathione Transferase Isoforms GSTP1-1, GSTA4-4, and GSTK1-1 in Tumor Cells during the Formation of Drug Resistance to Cisplatin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2012. – Vol. 154. – N 1. – P. 64-67.
4. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Березов Т.Т., Штиль А.А., Глазунова В.А., **Новичкова М.Д.**, Нурмурадов Н.К., Суханов В.А. Редокс-зависимые механизмы формирования мультилекарственной резистентности опухолевых клеток и регуляция экспрессии генов изоформ глутатионтрансферазы // Девятая Международная Крымская конференция «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» 16-25 сентября 2013 г., Украина, Крым, Судак. – С. 31.
5. Kalinina E.V., Chernov N.N., **Novichkova M.D.** Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes // Biochemistry (Moscow). – 2014. – Vol. 79. – N 13. – P. 1562-1583.
6. **Новичкова М.Д.**, Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Нурмурадов Н.К., Башаров М.М. Экспрессия генов изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». (Материалы XVI Всемирного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке» 16 по 26 ноября 2014, Россия-Индия). – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 256.
7. Elena Kalinina, Nikolay N. Chernov, **Maria D. Novichkova.** Overexpression of isoforms of glutathione transferase and their antioxidant role under development of cancer cell resistance to cisplatin // 5th Asia Pacific ISSX Meeting. 9-12 May 2014, Tianjin China, P213.
8. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., **Новичкова М.Д.**, Нурмурадов Н.К., Суханов В.А. Особенности редокс-зависимого механизма развития резистентности опухолевых клеток к цисплатину // Труды XXII Международной Конференции и Дискуссионного Научного Клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology. IT + M&E`2014, Крым, Ялта-Гурзуф, 02-12 июня 2014 г. – С. 51-53.

9. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Башаров М.М., **Новичкова М.Д.**, Нурмурадов Н.К., Суханов В.А. Скоординированное изменение экспрессии редокс-зависимых генов в механизме развития адаптивного антиоксидантного ответа при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Сборник материалов 8-ой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», Смоленск, Россия, 25-29 мая 2014 г. – Смоленск: ООО «ТМ Диджитал», 2014. – С. 82-84.
10. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., **Новичкова М.Д.**, Нурмурадов Н.К. Роль глутатиона в редокс зависимых процессах регуляции формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2015. – Т. 17. – № 3. – С. 55-56.
11. Elena Kalinina, Nikolay N. Chernov, Marcel Basharov, **Maria Novichkova**. Tripeptide glutathione as redox regulator for development of cancer cell drug resistance // *Amino Acids*. – 2015. – Vol. 47. – N 8. – P. 1654.
12. **Новичкова М.Д.**, Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Башаров М.М., Нурмурадов Н.К. Адаптивный антиоксидантный ответ как редокс-зависимый механизм формирования лекарственной резистентности опухолевых клеток // Материалы Седьмой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» - Молодежного симпозиума «Медико-биологические и экологические аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», 21-22 апреля 2015 года, Новосибирск / Под ред. В.А. Шкурупия. – Новосибирск: ИП Пермяков С.А., 2015 (368 с.). – С. 199-200.
13. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., **Новичкова М.Д.**, Башаров М.М., Нурмурадов Н.К. Адаптивный антиоксидантный ответ и редокс-зависимая регуляция транскрипции генов в механизме лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биантиоксидант: тезисы докладов IX Международной конференции, Москва, 29 сентября – 2 октября 2015 г. – М.: РУДН, 2015 (218 с.). – С. 77.
14. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., **Новичкова М.Д.**, Нурмурадов Н.К. Роль изоформ тиоредоксина, глутаредоксина и пероксиредоксина в редокс-зависимых процесса формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток // АСТА NATURAE. – 2016. – Спецвыпуск, Том 2. – С. 172. (Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM, Сочи–Дагомыс, 4-9 октября 2016 г.)
15. **Новичкова М.Д.**, Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Нурмурадов Н.К. Редокс-регуляции лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции IT +M&Ec`2016 (Гурзуф, с 02 по 12 июня 2016 г.). 2016. Весенняя сессия. С. 71-76.
16. Kalinina E., Chernov N., **Novichkova M.**, Nurmuradov N. Thioredoxins, glutaredoxins and peroxiredoxins in redox-dependent formation of cancer cell resistance // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 108. – Suppl 1. – P. S34-S35. – P-052.
17. Kalinina E., Chernov N., Petrova A., **Novichkova M.** Coordinated alteration of expression of redox-dependent genes in development of adaptive antioxidant response under formation of drug resistance of cancer cells // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 108. – Suppl 1. – P. S49. – P-092.
18. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., **Новичкова М.Д.**, Петрова А.С., Нурмурадов Н.К. Адаптивный антиоксидантный ответ и лекарственная устойчивость опухолевых клеток // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и

- экологии: материалы Международной конференции IT +M&Eс`2017 (Гурзуф, с 02 по 12 июня 2017 г.). 2017. Весенняя сессия. С. 247-250.
19. Elena Kalinina, Nikolay Chernov, **Maria Novichkova**. Glutathione in redox regulation of the development of cancer cell resistance // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 120, Suppl 1. – S137.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК	активные формы кислорода
ASK1	регулирующая апоптотические сигналы киназа 1
Bax	проапоптотический белок семейства белков Bcl-2
Bcl-2	антиапоптотический белок семейства белков Bcl-2
Bcl-xl	антиапоптотический белок семейства белков Bcl-2
CDDP	цисплатин, цис-диаминдихлорплатина
γ -GCS	γ -глутамилцистеинсинтетаза
γ -GCSH	каталитическая субъединица γ -глутамилцистеинсинтетазы
γ -GCSL	регуляторная субъединица γ -глутамилцистеинсинтетазы
Grx	глутаредоксин
GS	глутатионсинтетаза
GSH, GSSG	восстановленный и окисленный глутатион
GST	глутатионтрансфераза
γ -GT	γ -глутамилтрансфераза
JNK1	c-Jun-N-копцевая киназа 1
MAP-киназа	митоген-активируемая протеинкиназа
Nrf2	NF-E2-зависимый фактор 2

НОВИЧКОВА МАРИЯ ДМИТРИЕВНА (Российская Федерация)
«Глутатионтрансферазы и глутаредоксины в редокс-зависимых процессах формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток»

Исследования выполнены на опухолевых клетках эритролейкемии человека K562, аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и аденокарциномы яичника человека SKOV-3 при формировании резистентности к цисплатину, обладающему прооксидантными свойствами. В резистентных опухолевых клетках обнаружен рост экспрессии генов изоформ GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1 и GSTK1-1, вносящих значимый вклад в систему антиоксидантной защиты, регуляцию клеточного сигналинга. В устойчивых клетках показан одновременный рост экспрессии генов митохондриальной и цитоплазматической изоформ глутаредоксина, участвующих в редокс-зависимом метаболизме смешанных дисульфидов. Продемонстрирован скоординированный рост экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза GSH *de novo*, что обеспечивает резистентные клетки повышенным уровнем соотношения GSH/GSSG. В резистентных клетках установлено повышение внутриклеточного содержания редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2. Установлено, что сохранение высокого уровня активности GST и Grx при высоком уровне соотношения GSH/GSSG способствует защите резистентных клеток от апоптотической гибели в условиях окислительного стресса, индуцированного применением перекиси водорода и цисплатина.

NOVICHKOVA MARIA DMITRIEVNA (Russian Federation)
“Glutathione S-transferases and glutaredoxins in the redox-dependent process of formation of drug resistance of tumor cells”

The studies were performed on human erythroleukemia K562 cells, human breast carcinoma MCF-7 cells, human ovarian carcinoma SKOV-3 cells with the development of resistance to cisplatin, which has pro-oxidant properties. In resistant tumor cells, the increase in the expression of genes encoding GSTP1-1, GSTA4-4, GSTT1-1, GSTM1-1 and GSTK1-1 isoforms was found, which significantly contribute to the antioxidant defense system, and regulation of cell signaling. The simultaneous growth of expression of genes encoding mitochondrial and cytoplasmic isoforms of glutaredoxin involved in redox-dependent metabolism of mixed disulfides was shown in resistant cells. The coordinated increase in the expression of genes encoding GSH *de novo* synthesis enzymes was demonstrated, which provided resistant cells with an elevated GSH/GSSG ratio. The increase in intracellular content of the redox-dependent transcription factor Nrf2 was found in resistant cells. It was found that the preservation of a high level of GST and Grx activity at a high level of the GSH/GSSG ratio contributes to the protection of resistant cells from apoptotic death in conditions of oxidative stress induced by the use of hydrogen peroxide and cisplatin.