

# ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

3  
ТОМ 49  
2003

---

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1955 года

---

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ · 2003

Е.В.Калинина<sup>1</sup>, А.Н.Саприн<sup>1</sup>, В.С.Соломка<sup>1</sup>, Н.П.Шербак<sup>2</sup>, Л.А.Пирузян<sup>1</sup>

## ПОДАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА, КИСЛОРОДНЫХ И СЕМИХИНОННЫХ РАДИКАЛОВ В ХОДЕ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК K562 ЭРИТРОЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА К ДОКСОРУБИЦИНУ

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем фармакологии РАН, Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН,  
<sup>2</sup>НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Многофакторный механизм развития лекарственной резистентности стимулирует значительный интерес к химиотерапевтическим препаратам с прооксидантным действием, что обусловлено активирующим эффектом окислительного стресса в опухолевых клетках. Исследовано изменение продукции  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  и уровня свободных радикалов в клетках K562 эритролейкемии человека в ходе формирования резистентности к доксорубину (ДОК). Установлено, что развитие резистентности к ДОК приводит к супрессии внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  при одновременном росте активностей катаболизирующих перекись водорода ферментов — каталазы и глутатионпероксидазы. В то же время в клетках K562/ДОК наблюдается заметное снижение эндогенного уровня образования  $O_2^{\cdot-}$ , связанное в значительной степени с резким снижением активности ксантиноксидазы и с ростом активностей Cu,Zn-супероксиддисмутазы и Mn-супероксиддисмутазы. Более низкий уровень прироста образования  $O_2^{\cdot-}$  в резистентных клетках по сравнению с чувствительными установлен также при внесении в культуральную среду ДОК (8 мкг/мл). Кроме того, формирование резистентности приводит к подавлению уровня образования семихинонных радикалов. Полученные данные свидетельствуют в пользу роли адаптивного антиоксидантного ответа в механизме развития клеточной резистентности к доксорубину.

**Ключевые слова:** перекись водорода, супероксидный радикал, резистентность, доксорубин.

Формирование лекарственной устойчивости, вклад в развитие которой вносит целый ряд факторов, приводит к значительному снижению возможности развития программируемой клеточной гибели [8]. В то же время, механизм действия ряда химиотерапевтических препа-

ратов в определенной степени связан с развитием окислительного стресса, действие которого в зависимости от уровня генерации активных форм кислорода (АФК) служит причиной возникновения апоптоза или некроза [6, 10, 19]. Как известно, АФК могут являться факторами как инициации и промоции, так и прогрессии злокачественного роста, вызывая активацию перекисного окисления липидов, повреждение ДНК с появлением мутаций, делеций, геной амплификации, а также вызывая активацию ряда проонкогенов и окисление целого ряда белков, что в свою очередь приводит к активации ингибирования антипротеаз, изменению в проведении клеточного сигнала и регуляции клеточной пролиферации [15, 32]. В этой связи значительный интерес вызывают процессы формирования лекарственной устойчивости к препаратам, обладающим прооксидантными свойствами. Способность доксорубина (ДОК), широко используемого в терапии онкологических заболеваний, в том числе в случае острых лейкозов, наряду с эффектом интеркаляции оказывать прооксидантное действие, связанное с генерацией АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и  $\cdot OH$  радикалов), обсуждается в течение достаточно длительного периода [17, 22]. Однако в последнее время все большее число данных свидетельствует в пользу роли свободно-радикального механизма активации ДОК в цитотоксическом эффекте препарата [25]. Тем не менее, вклад окислительного стресса, вызываемого ДОК, в процесс развития лекарственной резистентности остается малоизученным.

В настоящей работе исследовано изменение продукции  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  и уровня свободных радикалов в клетках K562 эритролейкемии человека в ходе формирования резистентности к ДОК.



**Материал и методика**

Клетки K562 эритролейкемии человека, любезно предоставленные проф.Т.М. Гринчук (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 Ед/мл гентамицина и 100 Ед/мл канамицина при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Резистентность клеток к ДОК достигалась методом ступенчатого повышения его концентрации (0,05–2,6 мкг/мл) [29]. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста [24].

Регистрацию спектров ЭПР проводили в замороженных при – 196 °С образцах клеток на спектрометре X-диапазона типа ECS-106 «Bruker» при амплитуде модуляции магнитного поля 0,5 мТл, частоте СВЧ поля кГц и мощности СВЧ 100 мВт. Уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оценивали флуориметрически по образованию дихлорфлуоресцеина (γ возбуждения — 488 нм, γ эмиссии — 530 нм) в результате инкубации клеточной суспензии с 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетатом в течение 1 ч при 37 °С [18, 30]. Уровень O<sub>2</sub><sup>•-</sup> оценивали флуориметрически после инкубации клеточной суспензии в течение 15 мин при 37 °С с дигидроэтидием, который окисляется супероксидом до этидия, флуоресцирующего в результате интеркаляции в ДНК (γ возбуждения — 488 нм и эмиссии — 600 нм) [28].

Клеточный лизат получали путем разрушения клеточной биомассы в результате действия осмотического шока и ультразвука (60–70 Гц) дважды по 30 с. Активность ксантиноксидазы оценивали по образованию урата [20]. Активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) и Mn-супероксиддисмутазы (Mn-SOD) определяли соответственно по методам [13, 23], принимая за единицу активности количество СОД, которое необходимо для снижения на 50% скорости восстановления цитохрома С в системе ксантиноксидазы [27]. Активность каталазы оценивали по убыли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [11]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по скорости окисления НАДФН по методу [26], используя в качестве субстрата H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Результаты и обсуждение**

Сравнительная оценка уровня генерации АФК в чувствительных (K562) и резистентных (K562/ДОК) клетках эритролейкемии человека (рис. 1, А) методом флуориметрии с использованием 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (что позволяет оценивать преимущественно внутриклеточный уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [18]) позволила установить снижение уровня перекиси водорода в ходе развития резистентности к ДОК (рис. 1, А). Снижение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в резистентных клетках может быть результатом роста активностей катаболизирующих перекись ферментов — каталазы и ГПО (рис. 1, Б). При этом наблюдается более выраженный рост активности ГПО, специфичность которой по отношению к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выше, чем у каталазы [3]. Образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может происходить неферментативно, а также в реакциях с участием ряда ферментов, в том числе СОД, оксидазы L-аминокислот, NO-синтазы [9]. В ходе развития резистентности активность как Cu,Zn-СОД, так и Mn-СОД в клетках K562/ДОК возрастает (рис. 2, Б, а), что подтверждает полученные нами ранее [4] результаты.

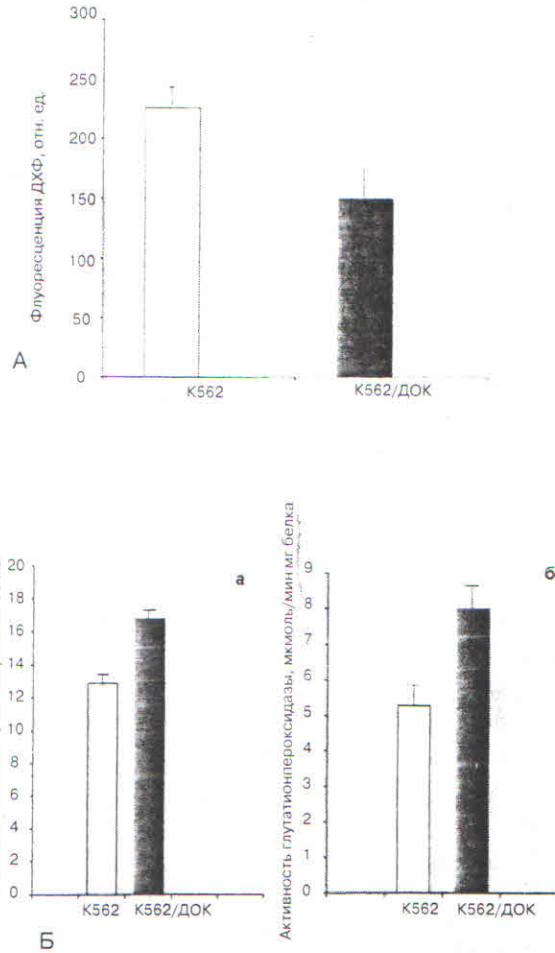


Рис. 1. Изменение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-зависимой системы в чувствительных (K562) и резистентных (K562/ДОК) к доксорубину клетках K562. А — уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по флуоресценции ДХФ; Б — активность каталазы (а) и глутатионпероксидазы (б).

В то же время, в клетках K562/ДОК наблюдается значительное снижение уровня O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (рис. 2, А). Таким образом, в резистентных клетках отмечается ускорение утилизации высокорационноспособного O<sub>2</sub><sup>•-</sup> с образованием менее реакционноспособной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Однако снижение уровня супероксида, в свою очередь, является основанием для снижения образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, которая быстро инактивируется в результате повышения активности антиоксидантных ферментов.

Следует отметить, что снижение эндогенного уровня супероксида в резистентных клетках связано не только с суммарным ростом активности СОД, но в значительной степени с подавлением активности ксантиноксидазы (2, Б, а), уровень которой в результате развития резистентности снижается в 2,9 раза, тогда как суммарная активность Mn-СОД и Cu,Zn-СОД уве-



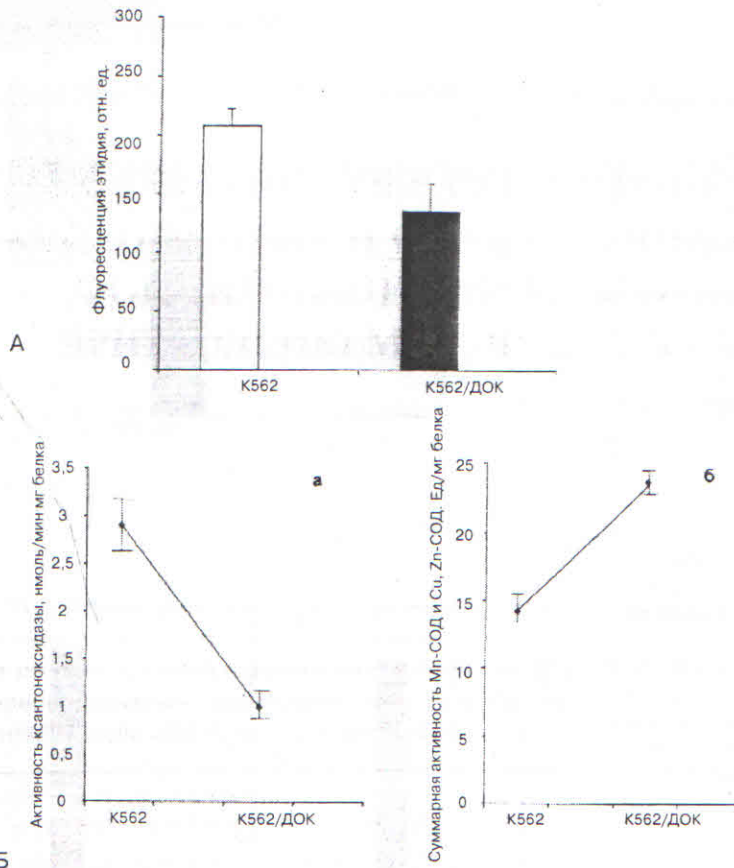


Рис. 2. Изменение продукции  $O_2^-$  в ходе формирования резистентности клеток K562 к доксорубину.

А — уровень  $O_2^-$  по флуоресценции этидия; Б — активность ксантиноксидазы (а) и суммарная активность Cu,Zn-SOD и Mn-SOD в чувствительных (K562) и резистентных (K562/ДОК) клетках.

личивается в 1,6 раза. Это также свидетельствует о формировании условий, приводящих к заметному снижению скорости образования  $H_2O_2$ . Значительное снижение активности ксантиноксидазы имеет большое значение для процесса развития резистентности к ДОК, так как способствует снижению скорости образования семихинонного радикала ДОК, образующегося в результате восстановления хинона в его структуре при действии ксантиноксидазы [12]. Это в свою очередь приводит к снижению скорости последующего образования  $\cdot OH$  радикалов и пероксидации ДНК. Прооксидантное действие ДОК обеспечивается за счет редокс-цикла хинона в структуре ДОК, что приводит к появлению семихинонного интермедиата и последующей генерации  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и  $\cdot OH$  радикалов [22]. В этой связи возможность образования семихинонного радикала, обусловленная активностью ксантиноксидазы, вносит существенный вклад в прооксидантный эффект ДОК и снижение активности этого фермента в ходе формирования резистентности. Это, по-види-

мому, является существенным элементом адаптивного механизма, направленного на снижение условий развития окислительного стресса, вызываемого длительной экспозицией к нарастающей концентрации ДОК.

Помимо ксантиноксидазы, источником образования  $O_2^{\cdot-}$  также могут служить электрон-транспортная цепь митохондрий, ядра и НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза эндоплазматического ретикулума [16, 31]. Тем не менее, значительное повышение активности антиоксидантных ферментов, в том числе митохондриальной Mn-SOD, по всей видимости, позволяет обеспечить высокий уровень антиоксидантной защиты в резистентных клетках.

Действительно, использование ЭПР-спектроскопии для оценки уровня свободнорадикальных процессов в чувствительных и резистентных клетках при условии их роста в отсутствие ДОК в культуральной среде позволило установить значительное снижение интенсивности сигнала ЭПР-спектра с фактором  $g=2,003$  в K562/ДОК клетках (рис. 3). Этот сигнал

обусловлен, в основном, уровнем семихинонных радикалов и зависит от активности митохондриального и микросомального окисления, а также от активности флавиносодержащих ферментов цитозольной фракции клеток [1, 33]. Изменение уровня семихинонных радикалов в резистентных клетках в значительной степени может быть связано, как показано нами ранее [4, 21], с развитием адаптивного антиоксидантного ответа в процессе формирования резистентности к ДОК.

Для оценки изменения способности клеток K562/ДОК к образованию  $O_2^{\cdot-}$  в ходе формирования резистентности к ДОК была использована концентрация последнего (8 мкг/мл), практически в 3 раза превышающая уровень максимально допустимой концентрации (2.6 мкг/мл), при которой сохраняется 100% выживаемость клеток. Установлено, что при внесении ДОК в культуральную среду наблюдается существенное повышение уровня образования супероксида как в чувствительных, так и резистентных клетках (рис. 4). Однако наблюдаемый прирост



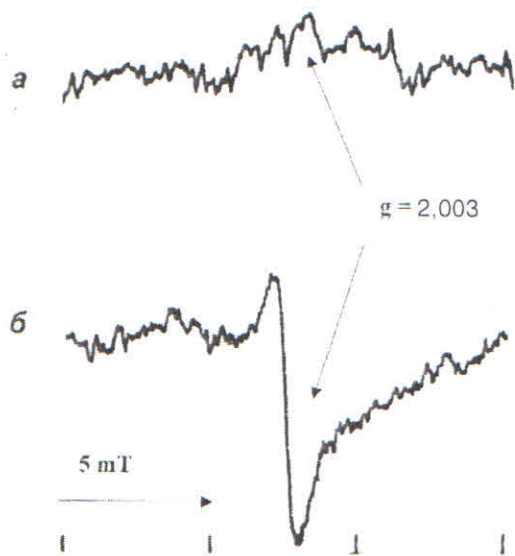


Рис. 3. ЭПР-спектры резистентных (а) и чувствительных (б) к доксорубину клеток K562.

образования  $O_2^{\cdot-}$  в резистентных клетках в 2,7 раза ниже, чем в чувствительных. Данное наблюдение отражает то обстоятельство, что процесс формирования резистентности к ДОК, являясь многофакторным, включает также рост уровня антиоксидантной защиты, препятствующей, наряду с другими факторами, лекарственной резистентности [5, 7, 14], развитию цитотоксического эффекта препарата.

Снижение уровня  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  в резистентных клетках говорит об уменьшении вероятности повреждения макромолекулярных мишеней — белков и ДНК. Наряду с этим, понижение уровня супероксида, как и снижение клеточного уровня  $H_2O_2$ , должно в свою очередь способствовать ослаблению процесса образования 'ОН радикалов в реакциях Фентон и Хабера — Вайса [2], что также снижает уровень АФК-зависимых повреждений. Поэтому полученные данные можно рассматривать как свидетельство образования в клетках K562/ДОК определенной системы защиты, направленной на подавление повреждающего действия АФК, что, по-видимому, способствует формированию резистентности к прооксидантному действию ДОК, позволяя блокировать развитие окислительного стресса.

В свою очередь снижение продукции АФК является редокс-зависимым механизмом регуляции процесса передачи клеточного сигнала, вызывая изменение активности ряда эффекторных молекул, в том числе транскрипционных факторов fos, myc, NF- $\kappa$ B, AP-1 [9], что, по-ви-

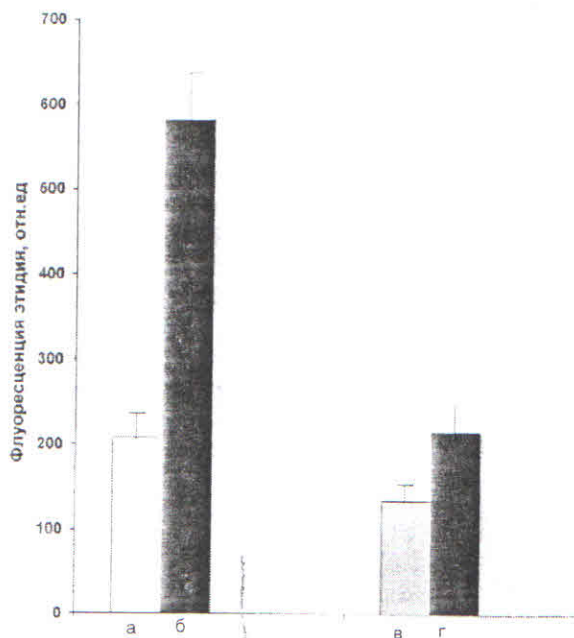


Рис. 4. Изменение уровня  $O_2^{\cdot-}$  по флуоресценции этидия в чувствительных (б) и резистентных (г) клетках K562 после действия доксорубина (8 мкг/мл) по сравнению с исходным уровнем (а, в).

димому, имеет важное значение для развития механизма клеточной резистентности. Более того, важным элементом снижения чувствительности резистентных клеток к цитотоксическому действию ДОК является, как было показано ранее [4], изменение соотношения ключевых факторов регуляции апоптоза (p53 и Bcl-2), что может быть следствием изменения клеточного редокс-статуса.

Таким образом, снижение уровня свободных радикалов и продукции АФК играет значительную роль в развитии резистентности к прооксидантному действию химиотерапевтического препарата. Наряду с ростом активности антиоксидантных ферментов процесс формирования резистентности включает супрессию эндогенной продукции  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и семихионных радикалов, что, повышая уровень клеточного редокс-статуса, участвует в возникновении и развитии адаптивного антиоксидантного ответа, способствующего развитию лекарственной устойчивости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бржевская О.Н., Каюшин Л.Н., Кондрашова М.Н. и др. Связанные с окислением субстрата и накоплением энергии ЭПР-сигналы метаболизирующих митохондрий // Биофизика.—1967.—Т. 12.—С. 839–844.
2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники, сер. Биофизика — ВИНТИ, 1991.—Т. 29.—252 с.



3. Зенков Р.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты.—М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001.—343 с.
4. Калинина Е.В., Саприн А.Н., Соломка В.С. и др. Роль антиоксидантной системы и редокс-зависимой регуляции в формировании резистентности клеток K562 эритролейкемии человека к доксорубину // *Вопр. онкол.*—2001.—Т. 47 (5).—С. 595–600.
5. Меликсетян М.Б., Березкина Е.В., Павленко М.А., Гринчук Т.М. Исследование механизмов лекарственной устойчивости двух клеточных линий хронического промиелолейкоза человека линии K562, резистентных к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II адриамицину и этопозиду // *Цитология.*—1999.—Т. 41 (7).—С. 615–621.
6. Саприн А.Н., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // *Успехи биол. химии.*—1999.—Т. 39.—С. 289–326.
7. Саприн А.Н., Калинина Е.В., Бабенко М.Д. Биохимические механизмы развития и регуляции мультилекарственной резистентности раковых клеток // *Успехи биол. химии.*—1996.—Т. 36.—С. 213–265.
8. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Биохимия.*—2000.—Т. 65, вып. 1.—С. 112–126.
9. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // *Биохимия.*—2002.—Т. 67(3).—С. 339–352.
10. Хансон К.П. Апоптоз: современное состояние проблемы // *Изв. РАН.*—1998.—№ 2.—С. 134–141.
11. Aebi H. Catalase in vitro // *Methods Enzymol.*—1984.—Vol. 105.—P. 121–126.
12. Bates D.A., Winterbourn C.C. Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: evidence for hydroxyl radical participation // *FEBS Let.*—1982.—Vol. 145.—P. 137–142.
13. Beauchamp C., Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ // *Biochim. Biophys. Acta.*—1973.—Vol. 317.—P. 50–52.
14. Bogush T., Robert J. Comparative evaluation of the intracellular accumulation and DNA binding of idarubicin and daunorubicin in sensitive and multidrug-resistant human leukaemia K562 cells // *Anticancer Res.*—1996.—Vol. 16.—P. 365–368.
15. Cerutti P.A. Prooxidant status and tumor promotion // *Science.*—1985.—Vol. 227.—P. 375–381.
16. Demin O.V., Kholodenko B.N., Skulachev V.P. A model of O<sub>2</sub> generation in the complex III of the electron transport chain // *Mol. Cell. Biochem.*—1998.—Vol. 184.—P. 21–33.
17. Doroshow J.H., Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase // *Cancer Res.*—1983.—Vol. 43.—P. 4541–4542.
18. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.-M. et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis // *Cell.*—1993.—Vol. 75.—P. 241–250.
19. Houghton J.A. Apoptosis and drug response // *Curr. Opin. Oncol.*—1999.—Vol. 11.—P. 475–481.
20. Hunt J., Massey V. Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase // *J. Biol. Chem.*—1992.—Vol. 267.—P. 21479–21485.
21. Kalinina E.V., Novichkova M.D., Saprin A.N. et al. GSH-dependent redox regulation and antioxidant enzymes in the formation of resistance to doxorubicin in K562 erythroleukemia cells // *Adv. Exp. Med. Biol.*—2001.—Vol. 500.—P. 241–244.
22. Lown J.W., Chen H.H., Plambeck J.A., Acton E.M. Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects // *Biochem. Pharmacol.*—1982.—Vol. 31.—P. 575–581.
23. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.*—1969.—Vol. 244.—P. 6049–6053.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.*—1983.—Vol. 63.—P. 55–63.
25. Muller I., Niethammer D., Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity // *Int. J. Mol. Med.*—1998.—Vol. 1.—P. 491–494; P. 682–692.
26. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *J. Lab. Clin. Med.*—1967.—Vol. 70.—P. 158–160.
27. Pritsos C.A. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system // *Chem.-Biol. Int.*—2000.—Vol. 129.—P. 195–208.
28. Rothe G., Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein // *Leukocyte Biol.*—1990.—Vol. 47.—P. 440–448.
29. Tsuruo T., Iida-Saito H., Kawabata H. et al. Characteristics of resistance to adriamycin in human myelogenous leukemia K562 resistant to adriamycin and in isolated clones // *Jpn. J. Cancer Res.*—1986.—Vol. 77.—P. 161–169.
30. Verhaegen S., McGowan A.J., Brophy A.R. et al. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line // *Biochem. Pharmacol.*—1995.—Vol. 50.—P. 1021–1029.
31. White R.E. The involvement of free radicals in the mechanism of monooxygenases // *Analyt. Ther.*—1991.—Vol. 49.—P. 224–227.
32. Wiseman H., Halliwell B. Damage of DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression of cancer // *Biochem. J.*—1996.—Vol. 313.—P. 17–29.
33. Wyard S.J. Electron spin resonance spectroscopy of animal tissues // *Proc. Roy. Soc. (A).*—1968.—Vol. 302.—P. 1470.

Поступила в редакцию 28.02.2002 г.