

МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

© 2017 г. Г.Г. Маргинович*, И.В. Маргинович*, А.В. Вчерашняя*, Н.К. Зенков**, Е.Б. Меньщикова**, Н.В. Кандалинцева***, С.Н. Черенкевич*

*Белорусский государственный университет, 220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь

E-mail: martinovichgg@bsu.by

**НИИ экспериментальной и клинической медицины, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

E-mail: lemen@centercem.ru

***Новосибирский государственный педагогический университет, 630126, Новосибирск, ул. Виллюйская, 28

E-mail: aquaphenol@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.17 г.

Исследовано влияние водорастворимых серосодержащих фенольных антиоксидантов 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфоната натрия и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтаната калия на химиорезистентность опухолевых клеток. Обнаружено, что исследуемые фенольные антиоксиданты вызывают противоположно направленные изменения редокс-свойств и химиорезистентности опухолевых клеток. Установлено, что 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанат калия увеличивает редокс-буферную емкость и резистентность опухолевых клеток к доксорубину. При действии 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфоната натрия наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению химиорезистентности опухолевых клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что одним из ключевых механизмов, ответственных за формирование устойчивости опухолевых клеток к действию противоопухолевых соединений, является ослабление апоптоза вследствие повышения редокс-буферной емкости. На основе предложенной биофизической модели редокс-зависимого механизма активации апоптоза установлена зависимость величины изменения редокс-состояния белкового сенсора от величин концентрации окислителя и редокс-буферной емкости клеток.

Ключевые слова: химиорезистентность, серосодержащие фенольные антиоксиданты, активные формы кислорода, опухолевые клетки, редокс-состояние, редокс-сигнализация.

Формирование устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических агентов является одной из причин недостаточной эффективности современной противоопухолевой терапии. Изучение механизмов адаптации опухолевых клеток к стрессу и разработка способов снижения их резистентности к действию физических, химических и биологических повреждающих факторов является актуальной задачей медицинской биофизики.

Согласно современным представлениям, регуляция клеточного ответа на стрессовые фак-

торы осуществляется с участием редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE (Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1, Nrf2 – NF-E2-связанный фактор 2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE), ARE – антиоксидант-респонсивный элемент) [1]. Ключевым элементом системы является фактор транскрипции Nrf2, контролирующей экспрессию генов, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность ARE [2]; на сегодняшний день выявлено более 500 таких генов [3]. Показано, что активация сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE посредством усиления синтеза ABCC1 (Mdr1), ключевого белка АТФ-зависимого экспорта ксенобиотиков из клеток, способствует развитию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [4,5]. Под контролем системы Keap1/Nrf2/ARE находятся также ключевые белки метаболизма глутатиона, увеличение кон-

Сокращения: Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1, Nrf2 – NF-E2-связанный фактор 2, ARE – антиоксидант-респонсивный элемент, Klf9 – Kruppel-подобный фактор 9, АФК – активные формы кислорода, ТС-13 – 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия, БЭК-11-К – 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанат калия, H₂DCF – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин, NAC – N-ацетил-L-цистеин.

центрации которого способствует выживанию клеток в стрессовых условиях [6,7].

Вместе с тем при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса. При высокой транскрипционной активности Nrf2 повышается содержание Ktuprel-подобного фактора транскрипции 9 (Klf9) [8]. В свою очередь, взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК изменяет экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма активных форм кислорода (АФК), включая НАДФН-оксидазу [8]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

В неактивном состоянии фактор транскрипции Nrf2 нековалентно связан со специфическим редокс-зависимым белком Keap1. Модификация SH-групп «ключевых» остатков цистеина в Keap1 за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к нарушению убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [2]. Активация Nrf2 осуществляется при действии ряда редокс-активных соединений, включая природные и синтетические фенольные антиоксиданты. Способность антиоксидантов регулировать транскрипционную активность Nrf2 зависит от их структурно-функциональных свойств [9]. Непрямое защитное действие антиоксидантов при окислительном стрессе, реализующееся с участием системы Keap1/Nrf2/ARE, наблюдается при более низких концентрациях соединений, чем те, которые необходимы для эффективного перехвата свободных радикалов в биологической среде [10].

Важно отметить, что ARE-активирующие свойства проявляют только хинонные формы соединений, которые образуются при взаимодействии фенолов с внутриклеточными активными формами кислорода [11]. Это позволяет рассматривать внутриклеточную продукцию АФК в качестве ключевого фактора, определяющего специфичность регуляторного действия антиоксидантов. В соответствии с современной концепцией редокс-сигнализации эффект регуляции функциональной активности клеток с участием АФК определяется не только их типом и концентрацией, но и типом и внутриклеточной концентрацией антиоксидантов, а также местом образования АФК [12]. Таким образом, эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников,

образующих электрон-транспортные цепи (редокс-цепи), и зависит от величин параметров редокс-гомеостаза [13,14].

Близкие по структуре эндогенные и экзогенные антиоксиданты могут выступать участниками разных электрон-транспортных цепей, запуская при этом различные клеточные ответы. Так, нами показано, что водорастворимые фенольные серосодержащие антиоксиданты 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия (ТС-13) и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиозаноат калия (БЭК-11-К) вызывают в опухолевых клетках регуляторные эффекты противоположно направленного действия [14,15]. Обнаружено, что ТС-13 индуцирует гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь, а БЭК-11-К стимулирует пролиферацию опухолевых клеток в культуре. Способность антиоксидантов взаимодействовать с фактором транскрипции Nrf2 предполагает их возможное участие в регуляции химиорезистентности опухолевых клеток. Однако роль синтетических фенольных соединений в формировании устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическому воздействию до сих пор не изучалась. В настоящем исследовании изучено действие водорастворимых фенольных антиоксидантов ТС-13 и БЭК-11-К на химиорезистентность опухолевых клеток, а также исследована роль внутриклеточного редокс-состояния в опосредовании эффектов действия на опухолевые клетки указанных антиоксидантов и противоопухолевых агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве редокс-активных соединений были использованы водорастворимые серосодержащие фенольные антиоксиданты БЭК-11-К и ТС-13, синтезированные в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия), а также серосодержащий антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (NAC) производства Sigma-Aldrich, США. Структура используемых антиоксидантов показана на рис. 1.

В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии HEP-2, которые культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 8–10% эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для определения влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение добавляли в чашки Петри через сутки после пересева клеток. Подсчет клеток проводили через трое суток культивирования. Пролиферативную активность

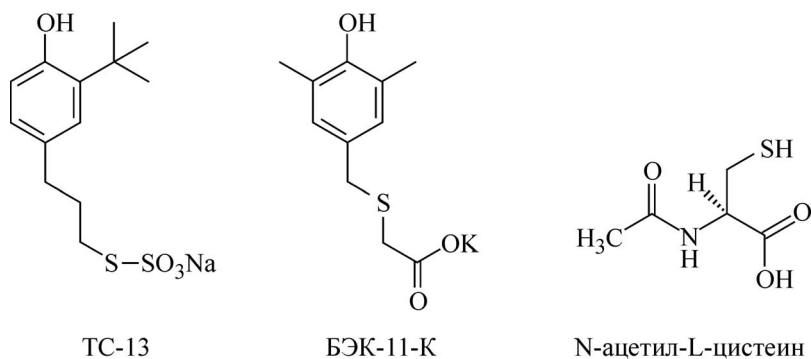


Рис. 1. Структурные формулы использованных антиоксидантов.

оценивали по индексу пролиферации, равному отношению количества клеток в среде после четырех суток культивирования к количеству клеток при посеве. Чувствительность модифицированных клеток к действию противоопухолевых агентов оценивали при их культивировании во втором пассаже без антиоксидантов. Определяли долю выживших клеток по отношению к контролю. Для получения суспензии клетки снимали раствором трипсин-версен в соотношении объемов 1 : 3 через шесть суток культивирования.

Оценку внутриклеточной продукции АФК проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H_2DCF) [16].

Для количественной характеристики изменений редокс-гомеостаза клеток использовали обоснованные нами новые физико-химические параметры – эффективный редокс-потенциал ($E^{эфф}$) и редокс-буферную емкость (r), значения которых определяли путем редокс-титрования на основе анализа скорости окисления H_2DCF вводимым в систему пероксидом водорода [17,18]. $E^{эфф}$ характеризует «суммарную» способность многокомпонентной внутриклеточной среды отдавать или принимать электроны и является количественной мерой работы по переносу единичного заряда в многокомпонентной редокс-системе [19]. Редокс-буферная емкость представляет собой количественную меру способности клеток противодействовать изменению величины $E^{эфф}$ внутриклеточной среды при изменении концентраций окислителей или восстановителей [18]. Параметры $E^{эфф}$ и r характеризуют стационарное редокс-состояние в клетках. Добавление окислителя к клеткам вызывает переход из одного стационарного состояния в другое. Новое стационарное состояние характеризуется величиной $E^{эфф} = E_0^{эфф} + \Delta E^{эфф}$. Зависимость $\Delta E^{эфф}$ от концентрации введенного в систему окислителя ($c_{ок}$) в двойных

обратных координатах описывается линейным уравнением с наклоном прямой $r = k_{эм}/\Delta E_{max}^{эфф}$ и пересечениями по оси ординат в точке $1/\Delta E_{max}^{эфф}$ и по оси абсцисс в точке $-1/k_{эм}$ [17]:

$$\frac{1}{\Delta E^{эфф}} = \frac{1}{\Delta E_{max}^{эфф}} + \frac{k_{эм}}{\Delta E_{max}^{эфф}} \frac{1}{c_{ок}}, \quad (1)$$

где $k_{эм} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i z_i}{z_{ок}}$.

Здесь $\Delta E_{max}^{эфф} = E_{ок}^0 - E_0^{эфф}$ – максимальное изменение величины эффективного редокс-потенциала, возможное при условии $c_{ок} \gg c_{вос}$, $z_{ок}$ – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму; c_i – концентрация i -й редокс-активной молекулы в биологической жидкости; z_i – число электронов, которые присоединяет молекула окисленной формы вещества, переходя в восстановленную форму; n – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния, $E_{ок}^0$ – редокс-потенциал окислителя при pH 7,0. Константа $k_{эм}$ имеет размерность концентрации и численно равна концентрации окислителя, при которой изменение величины эффективного редокс-потенциала составляет половину своего максимального значения.

В основе данного метода использована экспериментально и теоретически обоснованная зависимость между величиной индуцированного увеличением концентрации окислителей изменения $E^{эфф}$ и скоростью окисления H_2DCF ($V_{ф}$) [18]

$$V_{ф} = k_0 \Delta E^{эфф}. \quad (2)$$

Согласно уравнению (2) скорость изменения интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлороф-

луоресцеина пропорциональна величине изменения эффективного редокс-потенциала, поэтому r и $E^{\text{эфф}}$ определяются при анализе построенной на основании экспериментальных исследований зависимости $V_{\text{ф}}$ от $c_{\text{ок}}$. Согласно уравнениям (1) и (2) при повышении начального значения эффективного редокс-потенциала $E_0^{\text{эфф}}$ величина максимального значения $V_{\text{ф}}^{\text{max}}$ снижается.

Измерения проводили при температуре 37°C в сбалансированном буферном солевом растворе следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1,3 мМ, MgSO₄ – 1,3 мМ, KH₂PO₄ – 0,4 мМ, HEPES – 20 мМ, глюкоза – 6 мМ, pH 7,4. Суспензию клеток нагружали H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich, США), инкубируя с 10 мкМ зонда в течение 45 мин при температуре 37°C в сбалансированном буферном солевом растворе. Измерение интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина, образующегося при окислении H₂DCF, проводили при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (НПЦ «СОЛАР», Беларусь).

В качестве противоопухолевых соединений использовали доксорубин (Белмедпрепараты, Беларусь) и 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) (Sigma-Aldrich, США).

Приведенные в работе кинетические зависимости являются типичными для серии трех-пяти независимых экспериментов. Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для трех-пяти независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферативная активность опухолевых клеток при действии антиоксидантов. Для определения влияния антиоксидантов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемые соединения вводили в концентрации от 10 до 200 мкМ, что соответствует физиологическому диапазону значений внеклеточных концентраций для низкомолекулярных водорастворимых эндогенных антиоксидантов. Установлено, что величина и направление изменения пролиферативной активности при действии антиоксидантов зависит от их типа (рис. 2). Введение в культуру клеток БЭК-11-К в концентрации 60 мкМ вызывало увеличение пролифе-

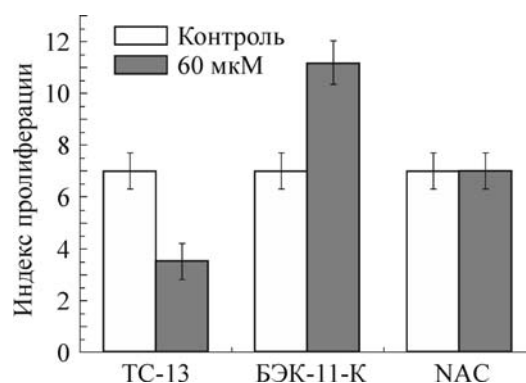


Рис. 2. Изменение пролиферативной активности клеток линии HEP-2 при культивировании с БЭК-11-К, ТС-13 и НАС. Концентрация антиоксидантов – 60 мкМ.

ративной активности на $60 \pm 15\%$. При действии ТС-13 в той же концентрации наблюдалось снижение пролиферативной активности на $50 \pm 12\%$. N-ацетил-L-цистеин в низких (60 мкМ) и высоких (1 мМ) концентрациях не вызывал изменения скорости роста опухолевых клеток в культуре.

Из представленных данных видно, что регуляторную активность в отношении опухолевых клеток проявляют только фенольные соединения. Следует отметить, что фенольный антиоксидант ТС-13 (в отличие от НАС) относится к группе индукторов ARE-регулируемых генов, и его действие в опухолевых клетках может осуществляться с участием сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE.

Изменения редокс-гомеостаза опухолевых клеток при действии антиоксидантов. При формировании клеточного адаптационного ответа с участием фактора транскрипции Nrf2 индуцируются изменения редокс-гомеостаза, поэтому следующим этапом нашего исследования была количественная оценка величин параметров редокс-гомеостаза в клетках контрольной группы и в клетках, культивируемых в присутствии исследуемых антиоксидантов.

Обнаружено, что изменения величин параметров редокс-гомеостаза при культивировании клеток с указанными антиоксидантами существенно различаются. На рис. 3а показаны зависимости величины флуоресцентного индекса $V_{\text{ф}}$ от концентрации окислителя в двойных обратных координатах для опухолевых клеток в контроле и при их культивировании с антиоксидантами. Определенные с использованием экспериментальных данных величины редокс-буферной емкости и изменения эффективного редокс-потенциала представлены на рис. 3б и 3в.

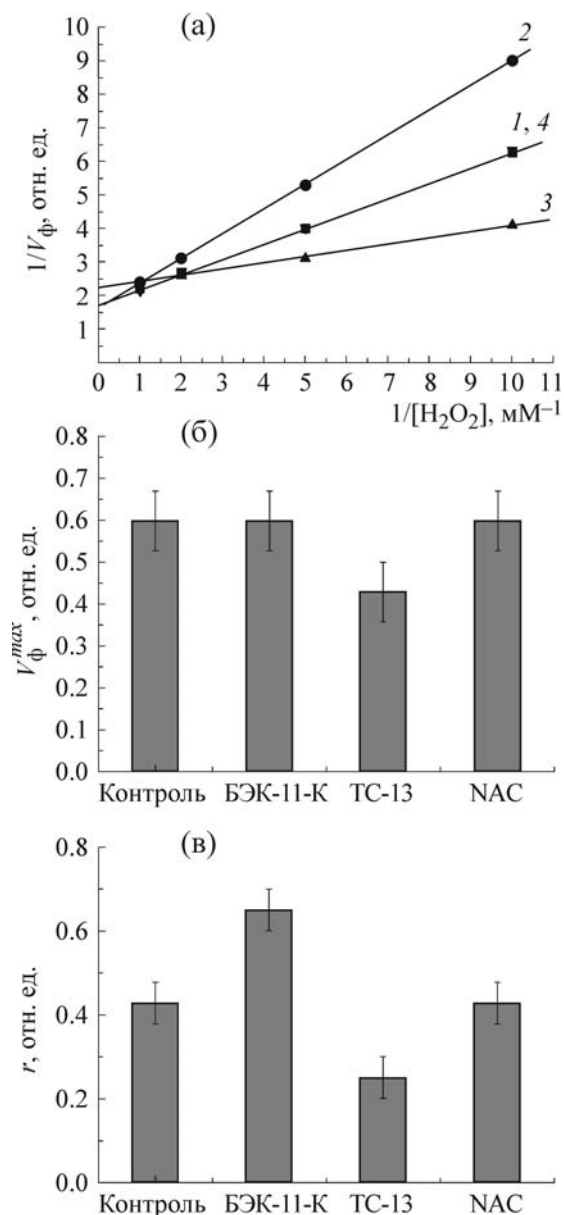


Рис. 3. Определение параметров редокс-гомеостаза клеток линии HEp-2. (а) – Зависимости величины V_{ϕ} в клетках от концентрации окислителя в двойных обратных координатах: 1 – контроль, 2 – клетки культивировали в присутствии БЭК-11-К (60 мкМ), 3 – клетки культивировали в присутствии ТС-13 (60 мкМ), 4 – клетки культивировали в присутствии НАС (60 мкМ). (б) – Изменение эффективного редокс-потенциала в контроле и при культивировании с антиоксидантами. (в) – Редокс-буферная емкость в контроле и при культивировании с антиоксидантами.

Редокс-буферная емкость клеток при культивировании с БЭК-11-К в концентрации 60 мкМ увеличивается на $50 \pm 10\%$, а при культивировании клеток с ТС-13 в концентрации 60 мкМ – уменьшается на $50 \pm 10\%$. Ве-

личина редокс-буферной емкости клеток при культивировании с НАС в концентрации 60 мкМ не изменяется. В свою очередь, величина эффективного редокс-потенциала не изменяется при культивировании клеток линии HEp-2 с антиоксидантами БЭК-11-К и НАС, а при культивировании с ТС-13 – повышается. Таким образом, индуцированное изменение величин параметров редокс-гомеостаза выявлено только для соединений, являющихся потенциальными индукторами ARE-регулируемых генов, т.е. для БЭК-11-К и ТС-13. В клетках линии HEp-2 при культивировании с ТС-13 в сравнении с клетками в контрольной культуре наблюдается усиление внутриклеточных окислительных процессов, что приводит к уменьшению величины редокс-буферной емкости и повышению значения эффективного редокс-потенциала. При культивировании клеток с БЭК-11-К запускается адаптационный ответ клеток, приводящий к увеличению содержания внутриклеточных восстановителей, что отражается повышением величины редокс-буферной емкости. Поскольку концентрация добавляемых антиоксидантов значительно ниже, чем эндогенных антиоксидантов, то наблюдаемые изменения редокс-свойств клеток, очевидно, обусловлены активацией специфических редокс-сигнальных механизмов.

В рамках механизма регуляции, включающего участие сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, наблюдаемые эффекты противоположно направленного действия, индуцируемые БЭК-11-К и ТС-13, объясняются их различной способностью регулировать активность данной системы. Так, ТС-13 является эффективным индуктором сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE [20], в то время как для БЭК-11-К такое свойство не исследовалось. Уменьшение величины редокс-буферной емкости и повышение величины эффективного редокс-потенциала при действии ТС-13 может быть следствием высокого выхода АФК в опухолевых клетках в результате индуцируемой при превышении порога активации Nrf2 экспрессии фактора транскрипции Klf9 и продуктов регулируемых им генов. Мутации Keap1, ведущие к нарушению его функционирования, обнаружены в карциномах различных органов [21,22]. В результате во многих опухолевых тканях и клеточных линиях опухолей наблюдается конститутивная активация Nrf2 [23], что во многом обуславливает неопределенность и неоднозначность действия экзогенных регуляторов сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE.

При действии ТС-13, индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE, происходит превышение оп-

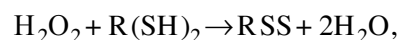
ределенного порога активации Nrf2, что приводит к стимулированию экспрессии фактора транскрипции Klf9. В свою очередь, взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК усиливает окислительный стресс путем изменения экспрессии ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК [8]. Учитывая структуру БЭК-11-К, нельзя исключить, что антиоксидант может вызывать низкую «подпороговую» активацию Nrf2, при которой запускается адаптационный ответ клеток, приводящий к повышению величины редокс-буферной емкости. В то же время нельзя не упомянуть, что наблюдаемое нами различие во влиянии соединений на пролиферацию опухолевых клеток может быть объяснено реализацией их эффектов через другие редокс-зависимые сигнальные системы [24].

Биофизическая модель редокс-зависимого механизма активации апоптоза. Изменения редокс-свойств клеток существенно влияют на процессы редокс-сигнализации, результатом может быть изменение метаболизма и функциональных свойств клеток. Концепция «редокс-сигнализации» объединяет внутриклеточные процессы трансдукции сигнала, в которых интегративным элементом выступает серия электрон-транспортных реакций с участием редокс-активных соединений (включая АФК и антиоксиданты) [12,25]. Молекулярным механизмом регуляции функционирования белков в редокс-сигнальных каскадах является неферментативное окисление депротонированных тиоловых групп цистеиновых остатков в молекулах белков-мишеней, приводящее к изменению их каталитических или сигнальных функций. Данный механизм не является специфическим для ряда редокс-активных соединений и запускается как эндогенными, так и экзогенными акцепторами электронов. Важным фактором, определяющим биологический эффект действия АФК в клетках, является внутриклеточная локализация продуцирующих их структур [26]. Ранее нами было показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигнализации клеток включает усиление локальной продукции АФК за счет участия специфических оксидоредуктаз – НАДН : убихинон оксидоредуктазы (ЕС 1.6.5.3) и убихинол : цитохром *c* оксидоредуктазы (ЕС 1.10.2.2) [27]. Согласно предложенному механизму, кроме редокс-активных соединений и их мишеней в редокс-регуляторных процессах участвуют также белки-ферменты – оксидоредуктазы, локализация которых вблизи белков-мишеней определяет специфический отклик клеток. В рамках данной модели ключевым аспектом активации специфических редокс-сигналь-

ных механизмов является колокализация оксидоредуктаз, вовлеченных в образование АФК, и мишеней действия АФК, участвующих в реализации биологического ответа. Нами показано, что тимохинон, инициирующий более низкий выход АФК в сравнении с 1,4-бензохиноном, является более токсичным в отношении опухолевых клеток [28]. Высокая в сравнении с 1,4-бензохиноном токсичность тимохинона обусловлена активацией редокс-сигнального механизма запуска апоптоза, ключевым элементом которого является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, участвующих в продукции окислителей, и соответствующего редокс-сенсора – переносчика адениновых нуклеотидов, функциональное состояние которого регулируется путем окисления/восстановления сульфгидрильных групп.

Первичным свободным радикалом в митохондриях является супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet -}$), образование которого обычно происходит в электрон-транспортных цепях в результате переноса электронов с промежуточных элементов цепи на кислород [29]. Дисмутация супероксида присутствующей в митохондриальном матриксе Мп-супероксиддисмутазой (ЕС 1.15.1.1) ведет к образованию H_2O_2 . Согласно современным представлениям, именно пероксид водорода является основной молекулой группы АФК, участвующей в регуляторных процессах [30]. Образующийся в митохондриях H_2O_2 , в свою очередь, вызывает окисление сульфгидрильных групп переносчика адениновых нуклеотидов, известного также как АДФ/АТФ-транслоказа. Образование дисульфидов в АДФ/АТФ-транслоказе индуцирует ее связывание с порином потенциал-зависимого анионного канала и циклофилином D, что приводит к формированию пор высокой проницаемости и запуску программируемой гибели клеток [31,32].

В рамках данной модели белковые тиолы рассматриваются как нанопереклюватели в процессах трансдукции сигналов, что описывается следующей реакцией



где $\text{R}(\text{SH})_2$ – восстановленная форма белковых тиолов, RSS – белковый дисульфид.

Для запуска механизма апоптоза необходимо окисление определенного числа SH-групп (мишеней), что является порогом активации для данного процесса. Поскольку пероксид водорода может также участвовать в реакциях с другими восстановителями, содержание и тип которых определяют редокс-свойства внутри-

клеточного окружения, то величина концентрации окисленных SH-групп сенсора, образующихся при действии пороговой концентрации индуктора, зависит от внутриклеточной концентрации восстановителей.

Молекулы пероксида водорода могут взаимодействовать как с SH-группами сенсора, приводя к образованию активной (окисленной) формы сенсора, так и с молекулами восстановителей, при этом концентрация восстановленных SH-групп сенсора ($R(SH)_2$) не изменяется. С ростом концентрации восстановителей количество окисленных SH-групп сенсора будет уменьшаться, и, наоборот, при уменьшении концентрации восстановителей количество окисленных пероксидом водорода SH-групп сенсора будет увеличиваться. Таким образом, трансдукция сигнала с участием пероксида водорода при активации апоптоза будет зависеть от редокс-условий внутриклеточного окружения сенсора.

В первом приближении можно считать, что количество окисленных SH-групп сенсора пропорционально количеству электронов ($Q_{ок}$), переносимых с молекул $R(SH)_2$ на молекулы окислителя. С другой стороны, количество молекул $R(SH)_2$ пропорционально количеству электронов ($Q_{вос}$), переносимых с молекул восстановителя на молекулы окислителя. Математически данное предположение может быть записано следующим образом:

$$[RSS] = kQ_{ок} = kz_{ок}c_{ок}, \quad (3)$$

$$[R(SH)_2] = kQ_{вос} = k\sum_{i=1}^n z_i c_i, \quad (4)$$

где $[RSS]$ – концентрация окисленных SH-групп сенсора, $[R(SH)_2]$ – концентрация восстановленных SH-групп сенсора, $z_{ок}$ – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму, $c_{ок}$ – концентрация окислителя, z_i – число электронов, которые переносятся с молекулы восстановителя при окислении, c_i – концентрация i -го восстановителя, n – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния. Таким образом, редокс-состояние сенсора может быть определено на основе выражения

$$\frac{[RSS]}{[R(SH)_2]} = \frac{z_{ок}c_{ок}}{\sum_{i=1}^n z_i c_i}. \quad (5)$$

Полагаем, что общая концентрация сенсора (c_0) в процессе измерения не изменяется, т.е.

$$[RSS] + [R(SH)_2] = c_0 = \text{const}. \quad (6)$$

Тогда выражение (5) можно записать как

$$\frac{[RSS]}{c_0 - [RSS]} = \frac{z_{ок}c_{ок}}{\sum_{i=1}^n z_i c_i}. \quad (7)$$

Из выражения (7) следует, что при выполнении работы по окислению сенсора концентрация окисленных групп изменится на величину

$$[RSS] = c_0 \frac{z_{ок}c_{ок}}{z_{ок}c_{ок} + \sum_{i=1}^n z_i c_i}, \quad (8)$$

или

$$[RSS] = c_0 \frac{1}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{z_{ок}c_{ок}}}. \quad (9)$$

В рамках термодинамического описания процесса имеем [13]:

$$\Delta E_{эфф} = \frac{\Delta E_{\max}^{эфф}}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{z_{ок}c_{ок}}}. \quad (10)$$

Из выражения (9) с учетом выражения (10) следует, что редокс-сенсоры являются сенсорами изменений величины эффективного редокс-потенциала:

$$[RSS] \sim \Delta E_{эфф}. \quad (11)$$

Изменение концентрации пероксида водорода вызывает изменение величины эффективного редокс-потенциала, что, в свою очередь, приводит к изменению редокс-потенциала сенсора и запуску клеточного ответа. При действии окислителя (пероксида водорода) величина индуцированного им изменения эффективного редокс-потенциала зависит от редокс-буферной емкости.

В свою очередь, зависимость величины редокс-буферной емкости от концентрации редокс-активных соединений имеет следующий вид [17,18]:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_{\text{ок}} \cdot \Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} \quad (14)$$

Тогда из выражения (10) с учетом выражения (14) следует, что при низких концентрациях окислителя $c_{\text{ок}}$ ($c_{\text{ок}} \ll \sum_{i=1}^k c_i z_i$) зависимость величины изменения эффективного редокс-потенциала от концентрации окислителя и редокс-буферной емкости выражается как

$$\Delta E^{\text{эфф}} \approx \frac{c_{\text{ок}}}{r} \quad (15)$$

Активация редокс-сенсора (следовательно, и активация апоптоза) осуществляется при достижении определенной величины внутриклеточного эффективного редокс-потенциала и зависит от редокс-буферной емкости. Снижение редокс-буферной емкости понижает порог активации апоптоза при действии эндогенных и экзогенных факторов, увеличение редокс-буферной емкости – повышает. Таким образом, в результате изменения редокс-состояния отклик клеток при действии редокс-активных соединений также изменяется.

В модельных условиях в клетках функции сенсора изменений внутриклеточного редокс-состояния выполняет также флуоресцентный зонд H_2DCF . В отличающихся редокс-условиях кинетика окисления зонда пероксидом водорода согласно выражению (15) будет различаться. Нами показано, что кинетика интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина, образующегося после добавления пероксида водорода, существенно различается в клетках, культивируемых с антиоксидантами БЭК-11-К, ТС-13 и без них (рис. 4). Уменьшение величины редокс-буферной емкости и повышение значения эффективного редокс-потенциала, наблюдаемые в клетках, культивируемых с антиоксидантом ТС-13, приводят к увеличению скорости окисления зонда H_2DCF . Введение антиоксиданта БЭК-11-К в культуру опухолевых клеток запускает компенсаторный адаптационный ответ, в результате которого изменяется внутриклеточное содержание редокс-активных соединений, в первую очередь, восстановителей. В клетках линии НЕР-2, культивируемых с антиоксидантом БЭК-11-К, рост концентрации восстановителей в сравнении с немодифицированными клетками приводит к снижению количества окисляемого пероксидом водорода зонда, что отражается в уменьшении интенсивности

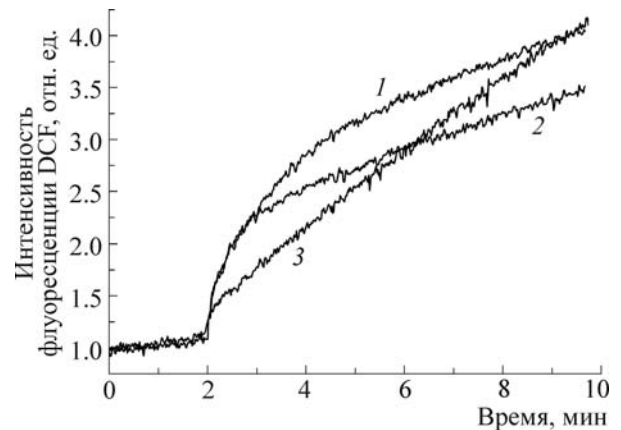


Рис. 4. Влияние H_2O_2 (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина в суспензии клеток линии НЕР-2: 1 – контроль; 2 – клетки культивировали в присутствии БЭК-11-К (60 мкМ); 3 – клетки культивировали в присутствии ТС-13 (60 мкМ).

флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина, образующегося в клетках при окислении H_2DCF пероксидом водорода.

Аналогичный эффект наблюдается и при трансдукции сигнала в клетках с участием АФК. Увеличение содержания восстановителей в клетке вызывает снижение числа АФК, взаимодействующих с белком-мишенью, в результате изменяется функциональный отклик клеток. При действии индукторов, активирующих запуск апоптоза по редокс-зависимому механизму, увеличение редокс-буферной емкости клеток на 50%, согласно выражениям (11) и (15), приведет к увеличению числа выживших клеток примерно на 50%. Таким образом, согласно предложенной модели повышение редокс-буферной емкости клеток должно приводить к ослаблению апоптоза. В свою очередь, снижение редокс-буферной емкости будет, наоборот, способствовать усилению апоптоза.

Ослабление апоптоза является одним из ключевых клеточных механизмов, ответственных за формирование устойчивости опухолевых клеток к терапии. Поэтому опухолевые клетки, подвергавшиеся воздействию более слабых индукторов Nrf2, должны проявлять более высокую химиорезистентность, чем контрольные, и, наоборот, клетки, подвергавшиеся воздействию сильных индукторов Nrf2, должны проявлять более низкую химиорезистентность.

Химиорезистентность опухолевых клеток при действии антиоксидантов. Для оценки резистентности модифицированных в результате действия антиоксидантов и немодифицированных клеток использовали противоопухолевый

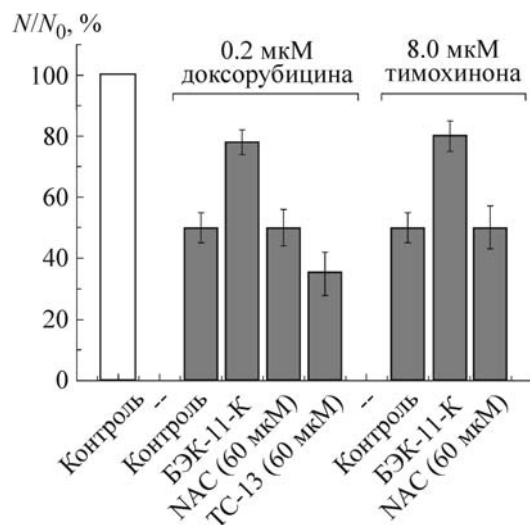


Рис. 5. Изменение числа клеток линии HEr-2 при культивировании с доксорубицином и тимохиноном. БЭК-11-К – клетки до посева культивировали с 60 мкМ БЭК-11-К, НАС (60 мкМ) – клетки до посева культивировали с 60 мкМ НАС, ТС-13 (60 мкМ) – клетки до посева культивировали с 60 мкМ ТС-13.

препарат доксорубицин. Концентрация доксорубицина, соответствующая 50% ингибирования пролиферативной активности, в контрольной (немодифицированной) группе клеток составила 0,2 мкМ.

Нами показано, что изменение редокс-состояния опухолевых клеток, приводящее к увеличению их редокс-буферной емкости, сопровождается также усилением резистентности клеток к противоопухолевым агентам. В культуре клеток, модифицированных БЭК-11-К, количество выживших при действии доксорубицина клеток было в полтора раза больше, чем в культуре немодифицированных клеток (рис. 5). В свою очередь, культивирование клеток с антиоксидантом НАС в низких (60 мкМ) и высоких (1 мМ) концентрациях не влияло на резистентность клеток к доксорубицину. Следует также отметить, что модифицированные при культивировании с БЭК-11-К клетки проявляют резистентность и к другим агентам, индуцирующим их гибель. Ранее нами было показано, что при действии тимохинона – биологически активного компонента *Nigella sativa* – в результате локального повышения продукции АФК в клетках линии HEr-2 индуцируется митохондриально-опосредованный апоптоз [28]. Токсическое действие тимохинона на клетки, до посева культивируемых в присутствии 60 мкМ БЭК-11-К, было менее выраженным, чем на клетки в контроле (рис. 5).

Известно, что культивирование с химиотерапевтическими препаратами в низких нетоксических дозах индуцирует повышение устойчивости клеток к ним. Выявленное нами ранее ингибирование роста опухолевых клеток антиоксидантом ТС-13 также позволяет рассматривать его в качестве перспективного противоопухолевого агента [15]. В настоящем исследовании показано, что снижение редокс-буферной емкости при действии ТС-13 способствует уменьшению резистентности опухолевых клеток, что является важным преимуществом в сравнении с «классическими» химиотерапевтическими агентами. Как показано на рис. 5, в культуре клеток, модифицированных ТС-13, количество выживших при действии доксорубицина клеток было меньше, чем в культуре немодифицированных клеток. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в опухолевых клетках при действии БЭК-11-К наблюдаются изменения редокс-гомеостаза, индуцирующие повышение резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым агентам. С другой стороны, индуцируемые при действии ТС-13 изменения редокс-гомеостаза способствуют снижению резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым агентам.

Первичная и приобретенная резистентность опухолевых клеток к цитостатическим и цитотоксическим препаратам – главная причина неудач химиотерапии при лечении большого числа злокачественных новообразований. В настоящее время широко обсуждаются и исследуются разнообразные факторы (фармакокинетические, метаболические, генетические, клеточные и др.), с которыми связывают первичную резистентность, колебания индивидуальной чувствительности опухолей или снижение их чувствительности к цитостатикам в процессе лечения при повторных курсах или циклах химиотерапии.

В рамках построенной нами модели обосновывается, что изменение редокс-свойств клеток, ведущее к увеличению концентрации восстановителей, вызывает ослабление индукции апоптоза и способствует формированию лекарственной устойчивости опухолевых клеток. В проведенном исследовании показано, что важными регуляторами редокс-свойств опухолевых клеток являются водорастворимые серосодержащие фенольные антиоксиданты. Обнаружено, что фенольный антиоксидант БЭК-11-К увеличивает редокс-буферную емкость и повышает химиорезистентность опухолевых клеток. При действии ТС-13 происходит уменьшение редокс-буферной емкости, что сопровождается снижением химиорезистентности опухолевых клеток.

Следует отметить, что наблюдаемые эффекты действия антиоксидантов могут быть опосредованы регуляцией специфической редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. Тип клеточного ответа при этом зависит от способности антиоксидантов регулировать активность Nrf2 и от редокс-условий в клетке. Данные об участии системы Keap1/Nrf2/ARE в инициации и прогрессировании новообразований крайне противоречивы [33]; исходя из точки зрения об аутопротективной сверхэкспрессии Nrf2 в опухолевых клетках, можно предположить, что «слабые» индукторы его активности повышают резистентность опухолевых клеток (и приводят к увеличению пролиферативной активности), а сильные – снижают резистентность и индуцируют апоптоз.

Разработка новых антиоксидантных препаратов является важным направлением развития современной фармакологии. Однако обнаружение сигнальных путей, регулируемых антиоксидантами, требует на современном этапе более детального изучения механизмов их действия. Проведенные нами исследования выявили способность антиоксидантов направленно регулировать химиорезистентность опухолевых клеток, что открывает новые возможности в разработке противоопухолевых технологий.

Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант № М16Р-022) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-54-00050).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. W. Kensler, N. Wakabayashi and S. Biswal, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89 (2007).
2. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова и В. О. Ткачев, *Биохимия* **78** (1), 27 (2013).
3. Н. К. Зенков, А. В. Чечушков, П. М. Кожин и др., *Биохимия* **81** (4), 429 (2016).
4. C. Xu, C. Y. Li, and A. N. Kong, *Arch. Pharm. Res.* **28**(3), 249 (2005).
5. X. J. Wang, Z. Sun, N. F. Villeneuve, et al., *Carcinogenesis* **29**, 1235 (2008).
6. X. Sun, H. Erb, and T. H. Murphy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326** (2), 371(2005).
7. M. Iida, S. Sunaga, N. Hirota, et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 619 (1997).
8. S. N. Zucker, E. E. Fink, A. Bagati, et al., *Mol. Cell* **53** (6), 916 (2014).
9. A. T. Dinkova-Kostova, J. W. Fahey, and P. Talalay, *Meth. Enzymol.* **382**, 423 (2004).
10. L. Saso and O. Firuzi, *Curr. Drug Targets* **15** (13), 1177 (2014).
11. X. J. Wang, J. D. Hayes, L. G. Higgins, et al., *Chem. Biol.* **17** (1), 75 (2010).
12. С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и др., *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук*, № 1, 92 (2013).
13. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **56** (3), 465 (2011).
14. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Б. Меньщикова и др., *Докл. НАН Беларуси* **59** (3), 82 (2015).
15. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Н. К. Зенков и др., *Биофизика* **60** (1), 120 (2015).
16. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биомед. химия* **51** (6), 626 (2005).
17. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **53** (4), 618 (2008).
18. G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **58** (2), 75 (2010).
19. G. G. Martinovich, S. N. Cherenkevich, and H. Sauer, *Eur. Biophys. J.* **34** (7), 937 (2005).
20. E. Menshchikova, V. Tkachev, A. Lemza, et al., *Inflamm. Res.* **63** (9), 729 (2014).
21. T. Ohta, K. Iijima, M. Miyamoto, et al., *Cancer Res.* **68**, 1303 (2008).
22. L. M. Solis, C. Behrens, W. Dong, et al., *Clin. Cancer Res.* **16**, 3743 (2010).
23. M. B. Sporn and K. T. Liby, *Nat. Rev. Cancer* **12**, 564 (2012).
24. X. Gào and B. Schöttker, *Oncotarget* (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.17128.
25. D. P. Jones, *J. Intern. Med.* **268**, 432 (2010).
26. L. S. Terada, *J. Cell Biol.* **174**, 615 (2006).
27. G. G. Martinovich, E. N. Golubeva, I. V. Martinovich, et al., *J. Biophys.* **2012**, 921653 (2012).
28. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Биофизика* **61** (6) 1164 (2016).
29. S. Raha and B. H. Robinson, *Trends Biochem. Sci.* **25**, 502 (2000).
30. H. Sies, *Redox Biol.* **11**, 613 (2017).
31. A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield, and C. P. Connern, *J. Biol. Chem.* **272**, 3346 (1997).
32. G. Kroemer and J. C. Reed, *Nat. Med.* **6**, 513 (2000).
33. L. Milkovic, N. Zarkovic, and L. Saso, *Redox Biol.* **12**, 727 (2017).

Mechanisms of Redox Regulation of Chemoresistance in Tumor Cells by Phenolic Antioxidants

G.G. Martinovich*, I.V. Martinovich*, A.V. Vcherashniaya*, N.K. Zenkov**,
E.B. Menshchikova**, N.V. Kandalintseva***, and S.N. Cherenkevich*

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Republic of Belarus

**Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

***Novosibirsk State Pedagogical University, ul. Vilyuiskaya 28, Novosibirsk, 630126 Russia

Effects of water-soluble sulfur-containing phenolic antioxidants 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propylthiosulfonate of sodium and potassium 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl thioetanoate on chemoresistance in tumor cells were studied. Explored phenolic antioxidants were found to cause oppositely directed changes in the redox properties and chemoresistance in tumor cells. It was established that potassium 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl thioetanoate increases the redox buffering capacity and doxorubicin resistance in tumor cells. By the action of sodium 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propylthiosulfonate the redox buffering capacity decreases, leading to a reduced chemoresistance in tumor cells. The obtained results suggest that one of the key mechanisms responsible for the formation of tumor cell resistance to antitumor compounds is attenuation of apoptosis through improvement of the redox buffering capacity. Based on the proposed biophysical model of the redox-dependent mechanism of apoptosis activation, the value of protein sensor redox state was determined as a function of the oxidant concentrations and the cellular redox buffering capacity.

Keywords: chemoresistance, sulfur-containing phenolic antioxidants, reactive oxygen species, tumor cells, redox state, redox signaling