

РОЛЬ ГЛУТАРЕДОКСИНА И ГЛУТАТИОНА В ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТЕКТОРА ТИОЛОВЫХ ГРУПП

Евгения Викторовна ШАХРИСТОВА, Елена Алексеевна СТЕПОВАЯ, Ольга Леонидовна НОСАРЕВА, Евгений Валерьевич РУДИКОВ, Мария Юрьевна ЕГОРОВА, Дария Юрьевна ЕГОРОВА, Вячеслав Викторович НОВИЦКИЙ

*Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

Цель исследования – установление роли глутаредоксина и глутатиона в регуляции пролиферации опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7 при действии протектора SH-групп 1,4-дитиоэритритола. **Материал и методы.** Исследования проводили в культуре опухолевых клеток молочной железы человека линии MCF-7. Редокс-статус клеток линии MCF-7 модулировали с помощью протектора SH-групп белков и пептидов 1,4-дитиоэритритола. Оценивали величину отношения восстановленной к окисленной форме глутатиона, концентрацию SH-групп белков, глутаредоксина, циклина E, циклинзависимых протеинкиназ 2 и 4, активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в интактных опухолевых клетках и в присутствии 1,4-дитиоэритритола. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что 1,4-дитиоэритритол снижает пролиферативную активность клеток линии MCF-7. Показано, что редокс-зависимая модуляция функционирования внутриклеточных белков, регулирующих пролиферацию, осуществляется при участии систем глутатиона и глутаредоксина. Данное направление исследований представляется перспективным для разработки персонализированных подходов для диагностики и терапии злокачественных новообразований молочной железы.

Ключевые слова: глутаредоксин, система глутатиона, аденокарцинома молочной железы, циклин-зависимые протеинкиназы, пролиферация.

Важную роль в жизнеспособности клеток играют редокс-зависимые процессы контроля над пролиферацией и программированной гибелью. Тиольные группы остатков цистеина в составе молекул белков и пептидов способны обратимо изменять свое редокс-состояние с последующими модификациями конформационных, каталитических и регуляторных свойств протеинов. Активация свободнорадикального окисления на фоне снижения резерва антиоксидантной защиты сопровождается изменением редокс-состояния

клеток и лежит в основе патогенеза многих социально-значимых заболеваний (сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные, онкологические и др.) [5, 6, 11].

Системы глутатиона и глутаредоксина функционально тесно взаимосвязаны и необходимы для поддержания редокс-статуса клеток. Глутаредоксин (КФ 1.20.4.1) представляет собой глутатион-зависимую оксидоредуктазу, играющую важную роль в регуляции редокс-зависимых клеточных процессов, он способен восстанавливать

Шахристова Е.В. – к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Степовая Е.А. – д.м.н., проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: tuiir@mail.ru

Носарева О.Л. – к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Рудиков Е.В. – интерн кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: korvin_w@mail.ru

Егорова М.Ю. – студентка 3-го курса лечебного факультета, e-mail: egorova.m.u.egorova@ya.ru

Егорова Д.Ю. – студентка 3-го курса лечебного факультета, e-mail: masha_dasha@mail.ru

Новицкий В.В. – д.м.н., проф., академик РАН, заведующий кафедрой патофизиологии

дисульфиды, в том числе и их смешанные формы с белками [2]. Для восстановления глутаредоксина необходим глутатион, поддержание восстановленной формы которого обеспечивается глутатионредуктазой, использующей в качестве донора протонов и электронов НАДФН [3].

Большинство исследований свидетельствует о том, что редокс-зависимая регуляция функционирования белковых молекул наиболее вероятно происходит в цитоплазме, где осуществляются ключевые процессы внутриклеточных сигнальных механизмов. В то же время в ряде работ показано, что редокс-протеины и глутатион могут обеспечивать регуляцию транскрипции определенных генов в ядре [7]. Поскольку многие транскрипционные факторы содержат остатки цистеина в ДНК-связывающих доменах, которые могут подвергаться окислению, большое значение имеет восстановительный потенциал систем глутатиона и глутаредоксина, необходимый для поддержания функционально-активного состояния белковых молекул. Несмотря на имеющиеся данные о выживании опухолевых клеток в условиях окислительного стресса [1, 2, 5, 13], остается открытым вопрос о механизмах редокс-регуляции, управления пролиферацией клеток и «ускользания» от апоптотической гибели.

Цель исследования – установить роль систем глутатиона и глутаредоксина в регуляции пролиферации опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7 при действии протектора SH-групп 1,4-дителиозитритола (DTE).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в культуре опухолевых клеток молочной железы человека линии MCF-7, полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90 % ЕМЕМ («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), 1 % заменимых аминокислот («ПанЭко»), 10 мкг/мл бычьего инсулина («ПанЭко»), 0,3 мг/мл L-глутамин («ПанЭко») и 100 мкг/мл гентамицина («MP Biomedicals», США). Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим («Serva», США). Для установления роли систем глутатиона и глутаредоксина в регуляции пролиферации опухолевые клетки инкубировали в течение 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂ в присутствии DTE («Sigma-Aldrich», США), защищающего SH-группы белков и пептидов от окисления, в конечной концентрации 5 мМ [10].

Протекторное действие DTE оценивали по концентрации SH-групп белков и пептидов в клетках линии MCF-7 методом, основанном на способности тиоловых соединений при взаимодействии с 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) образовывать окрашенное соединение 5'-тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм, регистрируемый спектрофотометрически [13]. Продукцию активных форм кислорода (АФК) определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитометре «FaCSCanto II» («Becton Dickinson», США), клетки предварительно инкубировали с 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом в конечной концентрации 5 мкМ («Sigma-Aldrich»). Оценку распределения клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии по протоколу Cycle Test Plus («Becton Dickinson», США).

Концентрации общего, восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона определяли методом I. Rahman и соавт. [12], основанным на способности GSH взаимодействовать с ДТНБ. Введение в реакционную смесь глутатионредуктазы позволяет определять содержание общего глутатиона; для измерения концентрации GSSG образцы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывает восстановленный глутатион, поэтому в данном случае скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию GSSG. Поскольку наиболее информативным показателем редокс-состояния клеток является величина отношения восстановленной формы трипептида к окисленной (GSH/GSSG), то в данной работе мы приводим значения только этой величины [1, 5].

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) оценивали по НАДФН-зависимому восстановлению GSSG [16] с дальнейшим его взаимодействием с ДТНБ. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) определяли по способности катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидропероксидом *трет*-бутила [4]. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с аминокислотными остатками лизина и аргинина белковых молекул [8].

Внутриклеточное содержание глутаредоксина, циклина Е и циклин-зависимых протеинкиназ 2 (CDK2) и 4 (CDK4) определяли методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител («Abcam»; «Sigma-Aldrich», «Thermo Scientific» США соответственно) по протоколу фирмы-производителя. Расчет содержания исследуемых

двух белков проводили относительно концентрации референсного протеина β-актина.

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез. Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро–Вилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение редокс-статуса клеток аденокарциномы молочной железы достигалось добавлением в культуральную среду 5 мМ DTE [10] – низкомолекулярного серосодержащего углевода, поддерживающего SH-группы белков и пептидов в восстановленном состоянии. Культивирование клеток линии MCF-7 в присутствии DTE приводило к увеличению ($p < 0,01$) концентрации сульфгидрильных групп белков и возрастанию величины отношения GSH/GSSG по сравнению с

аналогичными показателями в интактной культуре (таблица). Добавление DTE в среду инкубации клеток аденокарциномы молочной железы способствовало снижению в 1,7 раза ($p < 0,01$) активности глутатионпероксидазы по сравнению с интактной культурой (см. таблицу), сопровождающемуся изменением редокс-статуса.

Системы глутатиона и глутаредоксина, осуществляя глутатионилирование/деглутатионилирование и восстановление дисульфидов, участвуют в поддержании структуры и функций редокс-регулируемых белков, в частности транскрипционных факторов [9], восстанавливают функциональную активность ферментов, в том числе глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, протеинтирозинфосфатазы 1B, креатинкиназы, каспазы-3 и др. [2].

Возрастание величины отношения GSH/GSSG в опухолевых клетках, культивируемых в присутствии протектора SH-групп белков и пептидов, могло способствовать увеличению активности редокс-регулируемых транскрипционных факторов, в частности Nrf2, контролирующего редокс-зависимую экспрессию ряда генов, в том числе глутатион-зависимых ферментов – глутатионтрансферазы и глутаредоксина. Так, мы установили в клетках линии MCF-7, культивируемых в присутствии DTE, возрастание в 2,0 раза ($p < 0,01$) активности глутатионтрансферазы и в

Таблица

Показатели системы глутатиона, концентрация глутаредоксина, АФК, циклина E, циклин-зависимых протеинкиназ 2 и 4 в клетках линии MCF-7 при действии протектора SH-групп белков DTE, Me (Q_1 – Q_3)

Показатель	Группа	
	Интактные MCF-7	MCF-7 + DTE
Величина отношения GSH/GSSG	9,71 (9,55–9,73)	10,65* (10,26–12,48)
Продукция АФК, у. е.	0,81 (0,80–0,83)	1,16 (0,81–1,17)
Содержание SH-групп белков, нмоль/мг белка	2,91 (2,22–3,03)	7,70* (7,52–7,93)
Активность глутатионредуктазы, мкмоль НАДФН/(мин × мг белка)	82,61 (81,66–84,45)	165,29* (163,67–179,52)
Активность глутатионпероксидазы, нмоль НАДФН/(мин × мг белка)	27,54 (23,14–30,06)	16,28* (14,43–17,18)
Содержание глутаредоксина, у. е.	1,43 (1,39–1,45)	1,76* (1,72–1,78)
Содержание циклина E, у. е.	1,18 (1,14–1,21)	0,59* (0,56–0,64)
Содержание циклин-зависимой протеинкиназы 2, у. е.	0,96 (0,94–1,12)	0,66* (0,55–0,71)
Содержание циклин-зависимой протеинкиназы 4, у. е.	0,35 (0,28–0,41)	0,05* (0,02–0,09)

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя интактных клеток MCF-7 статистически значимо при $p < 0,01$.

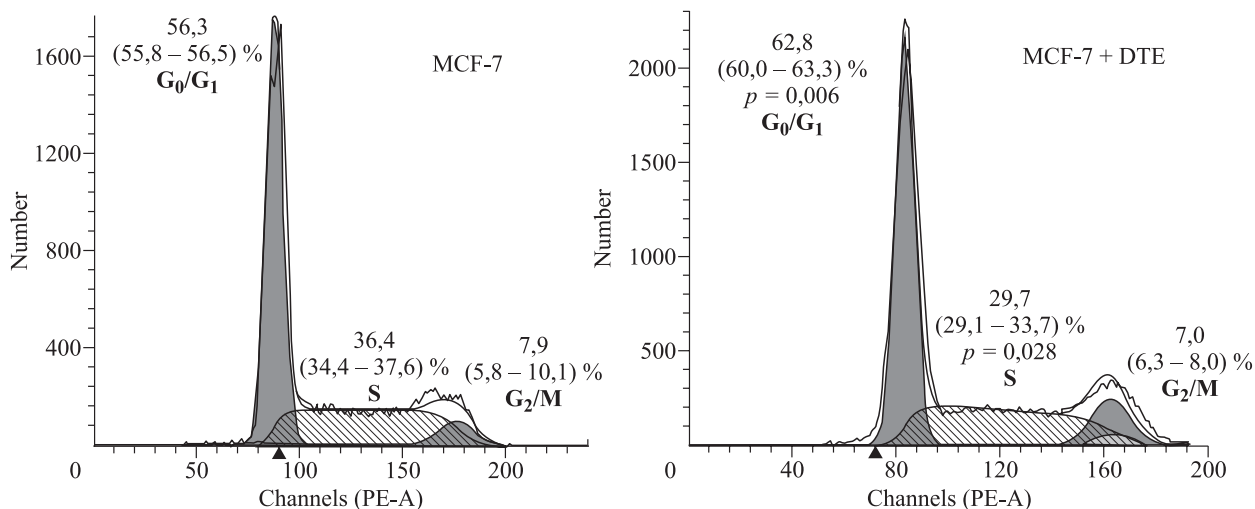


Рис. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы по фазам клеточного цикла при действии протектора тиоловых групп DTE, Me (Q_1-Q_3); p – уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7

1,2 раза ($p < 0,01$) концентрации глутаредоксина по сравнению со значениями аналогичных показателей в интактной культуре (см. таблицу). Кроме того, глутаредоксин был обнаружен в ядре клетки [15], где он участвует в работе рибонуклеотидредуктазы, осуществляющей синтез дезоксирибонуклеотидов в присутствии тиоредоксина.

В клетках линии MCF-7, культивируемых в присутствии DTE и имеющих более высокое значение величины соотношения GSH/GSSG, нами выявлено уменьшение концентрации CDK2 в 1,5 раза ($p < 0,01$), CDK4 в 7,0 раза ($p < 0,01$) и циклина E в 2,0 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактной культурой (см. таблицу). Это приводило к снижению пролиферативной активности опухолевой линии MCF-7 (рисунок): количество клеток в фазе G_0/G_1 увеличилось в 1,1 раза ($p < 0,01$), а в S-фазе – снижалось в 1,2 раза ($p < 0,05$). Увеличение концентрации глутатиона и глутаредоксина в опухолевых клетках при действии протектора сульфгидрильных групп могло способствовать глутатионированию остатков цистеина ДНК-связывающих доменов в составе редокс-чувствительных транскрипционных факторов, что приводило к снижению их способности взаимодействовать с молекулами-мишенями в ядре и уменьшению экспрессии циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ, приводя к нарушению регуляции пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы.

В результате проведенного нами исследования установлено, что культивирование клеток линии MCF-7 в присутствии протектора SH-групп белков и пептидов приводит к снижению пролиферативной активности клеток на фоне изме-

нения редокс-состояния, обусловленного уменьшением концентрации циклина E, CDK2 и CDK4 под влиянием систем глутаредоксина и глутатиона. Результаты наших исследований позволяют предполагать, что глутаредоксин и компоненты системы глутатиона могут являться молекулярными мишенями для последующей разработки персонализированных подходов диагностики и терапии злокачественных новообразований молочной железы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (грант № МК-1742.2017.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб., 2006. 400 с.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р. и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // Вестн. РАМН. 2010. (3). 46–54.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. 2009. 55. (3). 255–277.
4. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагно-

- стике: в 2 т. / Ред. А.И. Карпищенко. Т. 2. М., 2013. 792 с.
5. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др.* Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008. 284 с.
 6. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. 72. (2). 158–174.
 7. *Arner E.S.J., Holmgren A.* Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // Eur. J. Biochem. 2000. 267. (20). 6102–6109.
 8. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 7. (1, 2). 248–254.
 9. *Brigelius-Flohé R., Flohé L.* Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // Antioxid. Redox Signal. 2011. 15. (8). 2335–2381.
 10. *Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S.* The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli* // Arch. Biochem. Biophys. 1995. 316. (1). 327–333.
 11. *Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B. et al.* Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // J. Cell Biol. 1978. 76. (2). 439–447.
 12. *Lysell J., Vladic Y.S., Ciarlo N. et al.* Immunohistochemical determination of thioredoxin and glutaredoxin distribution in the human cervix, and possible relation to cervical ripening // Gynecol. Endocrinol. 2003. 17. (4). 303–310.
 13. *Rahman I., Kode A., Biswas S.K.* Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method // Nat. Protoc. 2006. 1. (6). 3159–3165.
 14. *Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y.* Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. 2012. 24. (5). 981–990.
 15. *Sedlak J., Lindsay R.H.* Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Anal. Biochem. 1968. 25. (1). 192–205.
 16. *Sengupta R., Holmgren A.* Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase // World J. Biol. Chem. 2014. 5. (1). 68–74.
 17. *Worthington D.J., Rosemeyer M.A.* Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation // Eur. J. Biochem. 1976. 67. (1). 231–238.

THE ROLE OF GLUTAREDOXIN AND GLUTATHIONE IN PROLIFERATION OF BREAST CANCER CELLS UNDER THE EFFECT OF 1,4-DITHIOERYTHRIOL, A THIOL GROUP PROTECTOR

**Evgeniya Viktorovna SHAKHRISTOVA, Elena Alekseevna STEPOVAYA,
Ol'ga Leonidovna NOSAREVA, Evgeniy Valerievich RUDIKOV,
Mariya Yurievna EGOROVA, Dariya Yurievna EGOROVA,
Vyacheslav Viktorovich NOVITSKIY**

*Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moscovski Trakt, 2*

The objective. To determine the role of glutaredoxin and glutathione in regulating proliferation of MCF-7 breast cancer cells under the effect of 1,4-dithioerythriol, an SH group protector. **Materials and methods.** The study was conducted in the culture of MCF-7 human breast cancer cells. We modulated the redox status of MCF-7 cells with 1,4-dithioerythriol, a protecting agent for SH groups. We estimated the reduced/oxidized glutathione ratio, the concentration of protein SH groups, glutaredoxin, cyclin E, cyclin-dependent kinase 2, and cyclin-dependent kinase 4. We also evaluated the activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase in intact tumor cells and in the presence of 1,4-dithioerythriol. **Results and discussion.** We found out that 1,4-dithioerythriol reduces the activity of MCF-7 cells. We showed that glutathione and glutaredoxin play an essential role in redox-dependent modulation of the functioning of proliferation-regulating intracellular proteins. This research area is promising for developing personalized approaches to diagnostics and therapy of breast cancer.

Key words: glutaredoxin, glutathione system, breast adenocarcinoma cells, cyclin dependent kinases, proliferation.

Shakhristova E.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Stepovaya E.A. – doctor of medical sciences, professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: muir@mail.ru

Nosareva O.L. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Rudikov E.V. – intern of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: korvin_w@mail.ru

Egorova M.Yu. – student, e-mail: egorova.m.u.egorova@ya.ru

Egorova D.Yu. – student, e-mail: masha_dasha@mail.ru

Novitskiy V.V. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, head of the chair for pathophysiology