

На правах рукописи

Хасан Асиль Али Шехадех

**ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА И КВЕРЦЕТИНА НА ТИОРЕДОКСИН-
ЗАВИСИМУЮ СИСТЕМУ И УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ**

1.5.4. Биохимия

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Москва
2023**

Работа выполнена на кафедре биохимии имени академика Т.Т. Березова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН).

Научный руководитель: **Елена Валентиновна Калинина**
доктор биологических наук, профессор
профессор кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

Научный руководитель: **Виктор Вячеславович Татарский**
кандидат биологических наук, доцент
заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии
Институт биологии гена РАН

Официальные оппоненты: **Шаройко Владимир Владимирович**
доктор биологических наук, профессор кафедры общей и
биоорганической химии, ведущий научный сотрудник
лаборатории биомедицинского материаловедения ФГБОУ ВО
«Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Киямова Рамзия Галлямовна
доктор биологических наук, старший научный сотрудник
заведующий кафедрой биохимии, биотехнологии и
фармакологии Института фундаментальной медицины и
биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»

Копейна Гелина Сергеевна
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории исследования механизмов апоптоза ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова».

Защита состоится 7 марта 2024 г. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор

Е.В. Лукашева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Наиболее распространенной причиной смерти среди женщин, связанной со злокачественными гинекологическим новообразованиями, является рак яичников (Momenimovahed et al. 2019). Общая 5-летняя выживаемость составляет менее половины заболевших женщин (Torre et al. 2018). Стандартная терапия рака яичников включает циторедуктивную операцию с последующим назначением адьювантной химиотерапии препаратами на основе платины, включая цисплатин (CDDP) (Borkar et al. 2021). Однако развитие резистентности к CDDP является серьезным препятствием для радикальной терапии рака (Makovec 2019). Феномен лекарственной устойчивости может развиваться посредством нескольких механизмов, в том числе за счет усиления систем детоксикации лекарственных средств и их активных метаболитов (Saha et al. 2012; T. Zhang et al. 2019). Развитие окислительного стресса в ответ на прооксидантное действие CDDP также играет заметную роль в развитии резистентности к CDDP при раке яичников (Belotte et al. 2014).

Регуляция уровня антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов является необходимой стратегией для предотвращения развития окислительного стресса (Zandi, Schnug 2022). В число наиболее известных механизмов формирования лекарственной устойчивости в настоящее время включаются редокс-зависимые пути регуляции (Bukowski, Kciuk, Kontek 2020).

В настоящее время результаты многих исследований свидетельствуют в пользу важной роли редокс-зависимых белков в поддержании клеточного редокс-гомеостаза и редокс-зависимой регуляции внутриклеточных процессов, в том числе пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Kobayashi, Imanaka, Shigetomi 2022; Tretter et al. 2021; Zuo et al. 2022). В антиоксидантной системе защиты клеток наряду с ключевыми антиоксидантными ферментами большое значение имеет тиоредоксин(Trx)-зависимая система, участвующая в редокс-зависимой регуляции посредством контроля тиол-дисульфидного обмена (Jastrzab, Skrzydlewska 2021; Balsera, Buchanan 2019; Patwardhan, Sharma, Sandur 2022). Сочетание антиоксидантных свойств и способности активировать транскрипцию антиоксидантных ферментов, а также ингибировать редокс-зависимые пути активации апоптоза свидетельствуют о важном вкладе этой системы в антиоксидантную защиту (Raninga, Di Trapani, and Tonissen 2014; Y. Zhang et al. 2020).

Одним из возможных подходов, обращающих развитие лекарственной резистентности, может быть использование модуляторов системы тиол-дисульфидного обмена, позволяющих регулировать состояние клеточного редокс-статуса. В этой связи, актуальным является исследование механизма преодоления лекарственной устойчивости соединениями из класса полифенолов, ингибирующих Trx-зависимую систему. Наиболее

перспективными из соединений этого класса являются куркумин и кверцетин, обладающие противоопухолевой активностью.

Степень разработанности темы исследования

Тгх-зависимая система включает дисульфидредуктазу тиоредоксин (Тгх) и ФАД-зависимую тиоредоксинредуктазу (ТгхR). Восстановленный Тгх необходим для восстановления дисульфидов, в частности окисленной формы пероксиредоксина, катализирующего разложение H_2O_2 , что снижает уровень активных форм кислорода (АФК) в клетке. В результате восстановления окисленного субстрата с участием Cys³² и Cys³⁵ активного центра дитиольной формы Тгх, образуется его окисленная форма, восстановление которого осуществляется НАДФН(H^+)-зависимая ТгхR (Lu and Holmgren 2014; Jastrzab and Skrzydlewska 2021).

Многочисленные исследования посвящены изучению роли Тгх-зависимой системы в онкогенезе. Гиперэкспрессия цитоплазматической, так и митохондриальной изоформ ТгхR (ТгхR1, ТгхR2) обнаружены при раках молочной железы, легких, полости рта, плоскоклеточный рак (Bhatia et al. 2016; Jia et al. 2019). Гиперэкспрессия генов изоформ Тгх в опухолевых клетках направлена на утилизацию избыточного количества АФК и тесно связана со степенью развития опухолевого процесса (Shang et al. 2019). Значительна роль Тгх-зависимой системы в активности редокс-зависимого сигналинга (J. Zhang et al. 2022).

Ранее совместными исследованиями кафедры биохимии РУДН с лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина установлено, что развитие резистентности клеток рака яичника к доксорубину, связано с редокс-зависимым изменением экспрессии генов изоформ Тгх и глутатионтрансферазы (Kalinina, et al. 2007a; Kalinina, et al. 2007b). Более того, глутаредоксин как тиолоксидоредуктаза и вторая антиоксидантная система катализирует процессы восстановления дисульфида и участвует в редокс-зависимой регуляции клеточной сигнализации (Seco-Cervera et al. 2020).

В настоящее время ведется активный поиск модуляторов Тгх-зависимой системы. Перспективную группу представляют полифенолы, к которым наблюдается постоянно растущий интерес из-за их противовоспалительного, противоопухолевого действия и антиоксидантной активности (Tungmunnithum et al. 2018; S. Kumar and Pandey 2013). Результаты исследований на линиях опухолевых клеток и экспериментальных моделях животных подтверждают эффективность комбинированной химиотерапии полифенолами, действующими по разным молекулярным механизмам. Несмотря на многообещающие результаты, вопросы об оптимальных комбинациях доз, потенциальных побочных эффектах и типе лекарственных форм остаются открытыми (Jakobušić Brala et al. 2023).

Цель работы. Изучить влияние куркумина и кверцетина на тиоредоксин-зависимую систему и устойчивость опухолевых клеток к цисплатину.

Задачи:

- 1) Оценить экспрессию генов, контролирующих клеточный редокс-статус - изоформ тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы и ключевых антиоксидантных ферментов в чувствительных и резистентных к цисплатину клетках аденокарциномы яичника SKOV-3.
- 2) Оценить влияние ингибиторов тиоредоксинредуктазы - куркумина и кверцетина на экспрессию генов ферментов Trx/TrxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов, сигнального пути PI3K/AKT/mTOR и транскрипционного фактора Nrf2 при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину.
- 3) Исследовать действие куркумина и кверцетина на устойчивость опухолевых клеток к цисплатину и окислительному стрессу.
- 4) Провести сравнительную оценку влияния куркумина и кверцетина на систему антиоксидантной защиты, уровень АФК и активацию программируемой клеточной гибели.

Научная новизна. Впервые показано, что «обращение» резистентности клеток аденокарциномы SKOV-3 к цисплатину, вызываемое куркумином и кверцетином, связано с подавлением экспрессии генов ферментов Trx/TrxR системы – изоформ тиоредоксина (*TRX1*, *TRX2*) и тиоредоксинредуктазы (*TRXDR1*, *TRXDR2*), контролирующих клеточный редокс-статус.

Впервые исследован редокс-зависимый механизм модуляции устойчивости клеток аденокарциномы SKOV-3 к цисплатину и показано, что комбинация кверцетина и цисплатина усиливает генерацию активных форм кислорода в резистентных клетках SKOV-3/CDDP и инициирует митохондриальный апоптоз путем активации расщепления каспаз 9, 7, 3 и PARP и подавления фосфорилирования белков сигнального пути mTOR/STAT3.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные расширяют представление о роли Trx/TrxR системы в редокс-зависимых механизмах формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Результаты о модулирующем действии необратимых ингибиторов TrxR – куркумина и кверцетина на антиоксидантный статус и сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR, mTOR/STAT3 и роли в этом процессе Trx/TrxR системы могут быть использованы при последующем изучении роли редокс-зависимой регуляции в механизмах гибели опухолевых клеток. Установленная эффективность куркумина и кверцетина в эффекте «обращения» лекарственной устойчивости аденокарциномы яичника SKOV-3 может быть использована в последующем для разработки новых схем химиотерапии.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является тиоредоксин-зависимая (Trx/TrxR) система. Предметом исследования является изучение роли тиоредоксин-

зависимой системы в редокс-зависимых процессах регуляции лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

Методология и методы исследования. В работе использованы методы биохимии, клеточной биологии, такие как ПЦР в режиме реального времени (Real-time RT-PCR), проточная цитофлуориметрия, оценка цитотоксичности с помощью МТТ теста, оценка уровня белка с помощью вестерн-блоттинга, а также методы статистического анализа данных.

Научные результаты, полученные лично автором, содержащие научную новизну, заключаются в следующих положениях, выносимых на защиту:

1. Формирование устойчивости к цисплатину у клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 сопровождается повышением экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов, киназ сигнального пути PI3K/AkT/mTOR.
2. В резистентных клетках действие необратимых ингибиторов TrxR - куркумина и кверцетина, вызывает значительное снижение экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов, киназ сигнального пути PI3K/AkT/mTOR, транскрипционного фактора Nrf2.
3. Куркумин и кверцетин повышают чувствительность резистентных клеток к цисплатину, что связано с подавлением экспрессии генов ферментов Trx/TrxR системы – изоформ тиоредоксина (*TRX1*, *TRX2*) и тиоредоксинредуктазы (*TRXDR1*, *TRXDR2*), контролирующей клеточный редокс-статус, и сопровождается активацией апоптоза в этих клетках.
4. Прединкубация с кверцетином повышает чувствительность резистентных клеток к цисплатину, вызывая снижение внутриклеточного уровня белков системы Trx/TrxR (изоформ тиоредоксина - *TRX1*, *TRX2* и тиоредоксинредуктазы - *TRXDR1*), контролирующей окислительно-восстановительный статус клеток, и сигнального пути mTOR/STAT3, что сопровождается усилением генерации активных форм кислорода и активацией митохондриального апоптоза.

Степень достоверности диссертационного исследования. Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством экспериментов с использованием самых современных методов в биохимии, молекулярной биологии и экспериментальной онкологии. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием современных методов анализа данных с применением программных пакетов MS Excel, Statistica 10, BioStat and graphpad.

Соответствие темы требованиям паспорта специальности ВАК. Работа выполнена в рамках паспорта специальности 1.5.4 - Биохимия: п.5 " Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и 3.1.6 -

Онкология: п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей».

Апробация результатов диссертационного исследования. По теме диссертации опубликованы 13 научных работ, в т.ч. 12 публикаций в ВАК/РУДН/МБЦ. Результаты работы представлены на 7 международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 160 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 326 источников. Диссертация иллюстрирована 29 рисунками и 6 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культура клеток. Работа выполнена на линии аденокарциномы яичника человека SKOV-3 (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения), чувствительной к CDDP, и сублинии SKOV-3/CDDP, полученной путём селекции клеток SKOV-3 на выживаемость в присутствии CDDP.

Схема оценки действия полифенолов. Настоящее исследование оценивает эффект куркумина или кверцетина при SKOV-3 и SKOV-3/CDDP с использованием двух разных групп оценки действия исследуемых полифенолов. В первой группе изучали действие куркумина (17 мкМ) и кверцетина (15 и 100 мкМ) в течение 24 часов. Во второй группе изучено влияние предварительной инкубации с кверцетином (60 мкМ в течение 48 часов) на цитотоксический эффект цисплатина (5 мкМ или 17 мкМ, 24, 48 и 72 ч; для SKOV-3 и SKOV-3/CDDP), соответственно).

В работе использованы следующие методы:

Для определения цитотоксичности использован МТТ-тест. Действие куркумина (1-50 мкМ) и кверцетина (50-300 мкМ) оценивали в зависимости от времени инкубации - 3, 6, 24, 48 ч, цисплатина (0,1-100 мкМ) - через 72 ч (37°C, 5% CO₂). Ингибирующий эффект прединкубации с QU с последующим применением CDDP на клетки был исследован более детально. После периода инкубации с QU (60 мкМ, 48ч) культуральную среду заменяли свежей средой, а затем клетки обрабатывали CDDP (5 мкМ, 1/2 IC₅₀, для SKOV-3) или (17 мкМ, 1/2 IC₅₀, для SKOV-3/CDDP) в течение 72 ч.

При оценке клеточного цикла анализ содержания клеточной ДНК проводили методом проточной цитометрии с окрашиванием PI. После окончания инкубации клетки лизировали в буфере, содержащем 0.1% цитрата натрия, 0.3% NP-40, 100 мкг/мл РНКазы А, 50 мкг/мл йодида пропидия (PI). Флуоресценцию ядер оценивали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD) в канале PE.

Экспрессию генов оценивали с использованием обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени (Real-time RT-PCR). Уровни мРНК нормализовали относительно экспрессии референсного гена *GAPDH*.

Метод вестерн-блоттинга использован для оценки внутриклеточного уровня специфичных белков. Общий белок в лизатах определяли количественно методом Брэдфорда. Белки разделяли с помощью 10–15% SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, затем последовательно инкубировали с первичными кроличьими антителами и вторичными антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Иммунореактивные полосы визуализировали с помощью хемилюминесценции с использованием системы Image Quant LAS 4000.

Оценку апоптотической гибели клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии по анализу клеток, окрашенных пропидий йодидом и аннексином V, конъюгированным флуорохромом FITC/APC (AnnV-FITC/APC). С использованием набора для обнаружения апоптоза аннексина V Thermo fisher kit в соответствии с протоколом производителя.

Определение уровня АФК проведено методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red. После инкубации клетки окрашивали красителем CellROX Deep Red в концентрации 5 мкг/мл в течение 40 мин при 37 °С в темноте и анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences) в канале APC (фильтр 660/20).

Статистическую значимость различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные серии аналогичных экспериментов (не менее трёх) представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Для статистического анализа и графического отображения использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США) и Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). * $p = 0,05/0,01$, ** $p = 0,005$, **** $p = 0,0001$.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оценка редокс-системы при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину. Оценка Trx/TrxR системы (изоформ Trx, TrxR, Prx) в резистентных SKOV-3/CDDP клетках.

В работе с помощью МТТ теста установлено значение IC_{50} CDDP для клеточной линии SKOV3 и сублинии SKVO3/CDDP, устойчивой к CDDP, используемых в качестве клеточных моделей (рис. 1) и определен индекс устойчивости к цисплатину для клеток сублинии SKOV-3/CDDP равный 3,4: (IC_{50} SKOV-3/CDDP – 34 мкМ; IC_{50} SKOV-3 -10 мкМ).

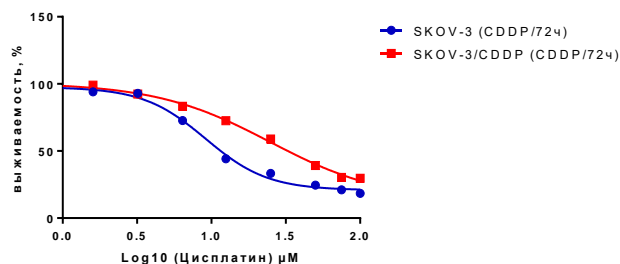


Рис. 1. Цитотоксичность CDDP *in vitro*. МТТ-анализ клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP после 72 ч действия цисплатина.

Результаты проделанной работы показывают, что развитие резистентности клеток SKOV-3 к CDDP, обладающему прооксидантным действием, связано с редокс-зависимым изменением экспрессии генов изоформ Trx и TrxR. В резистентных клетках SKOV-3/CDDP установлен значительный рост экспрессии генов Trx/TrxR системы: *TRX1*, *TRX2* - в 4,8 и 25 раз, *TRXRD1*, *TRXRD2* – в 23 и 89 раз соответственно (рис. 2). Высокий рост экспрессии установлен и для генов изоформ пероксиредоксина (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX6*), катализирующих разложение H_2O_2 (рис. 3). Максимальный рост экспрессии обнаружен у гена *PRDX2* (в 70 раз).

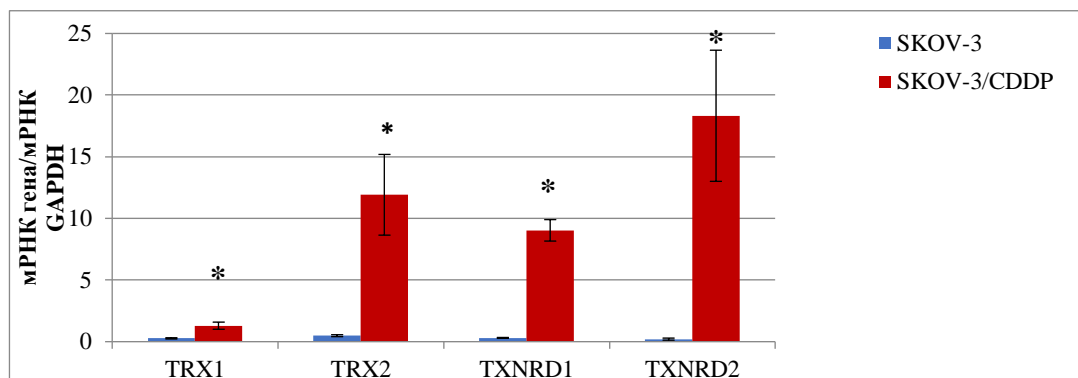


Рис. 2. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (*TRX1*, *TRX2*) и TrxR (*TRXRD1*, *TRXRD2*) в чувствительных (SKOV-3) и резистентных к цисплатину (SKOV-3/CDDP).

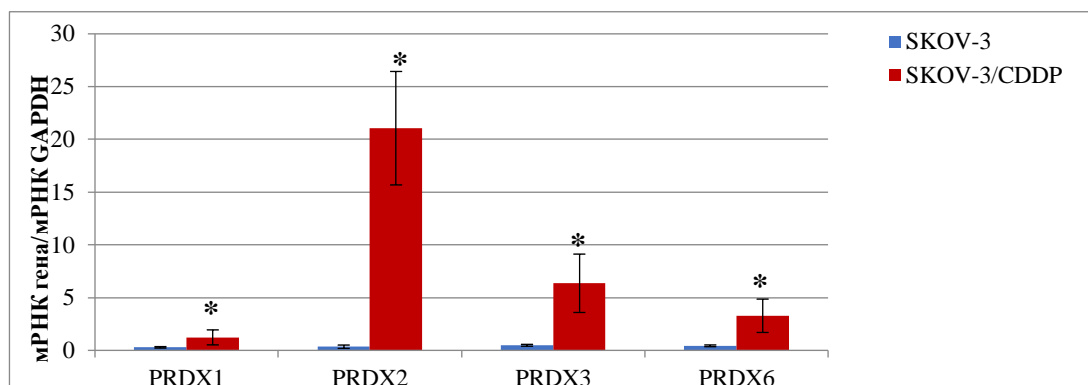


Рис. 3. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX6*) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

Оценка экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR при формировании устойчивости к цисплатину в SKOV-3 клетках

Значительное повышение экспрессии генов ферментов Trx/TrxR системы дополняется ростом экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов – Cu,Zn- и Mn-супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы 1, гемоксигеназы 1, каталазы (*SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *HO1*, *CAT*) и транскрипционного фактора Nrf2 (*NFE2L2*), контролирующего экспрессию указанных ферментов (рис.4).

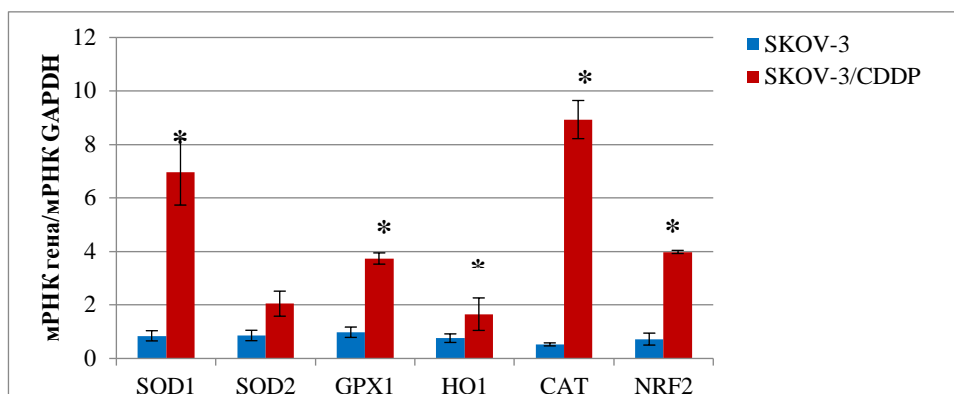


Рис. 4. Real-time RT-PCR анализ мРНК ключевых антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *HO1*, *CAT*) и транскрипционного фактора Nrf2 в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

Формирование резистентности к цисплатину в клетках устойчивой сублинии приводит к усилению сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, активность которого важна для регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза в опухолевых клетках путем. Оценка экспрессии генов *PI3K*, *AKT*, *MTOR* позволила установить значительный рост их экспрессии (рис. 5) в резистентных клетках (*PI3K* – в 20, *AKT* – в 18, *MTOR* – в 12 раз).

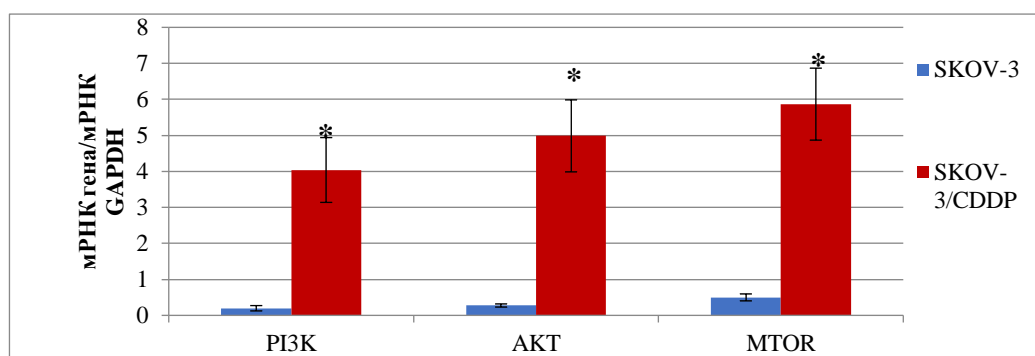


Рис. 5. Real-time RT-PCR анализ мРНК *PI3K*, *Akt*, *mTOR* в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

Оценка влияния кверцетина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину. Влияние кверцетина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

Исследование действия QU на клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP позволило установить снижение их жизнеспособности в зависимости от концентрации и времени инкубации (рис. 6, в).

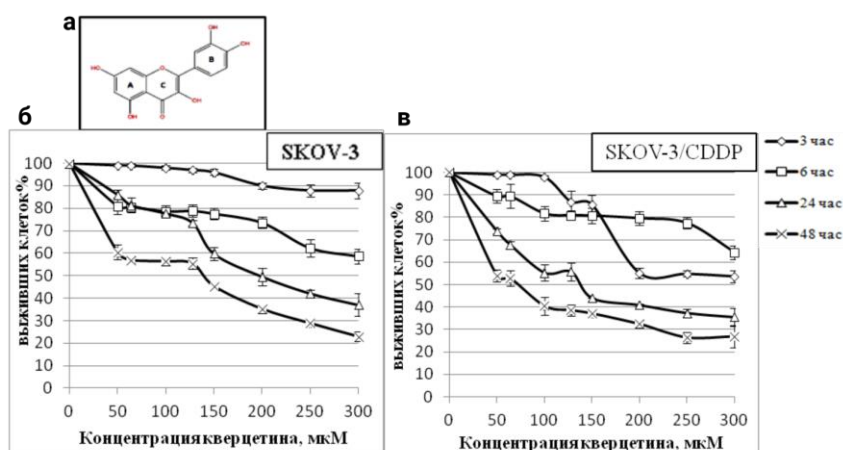


Рис. 6. Влияние кверцетина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к CDDP клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации.

Чтобы определить, снижает ли прединкубация с QU устойчивость клеточной линии SKOV3/CDDP к CDDP, нами разработана альтернативная стратегия прединкубации с QU в сравнении с классической индивидуальной инкубацией с QU или CDDP. (рис. 7 а).

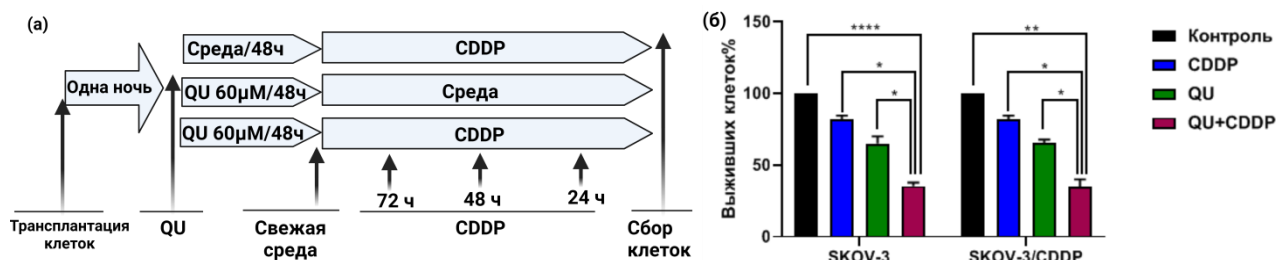


Рис. 7. Влияние QU на жизнеспособность клеток SKOV3 и SKOV3/CDDP. (а) Разработка стратегии прединкубации с QU. Клетки инкубировали с CDDP, QU с последующей заменой свежей средой, либо предварительно обрабатывали QU с последующим действием CDDP (б) Клетки инкубировали с QU (60 мкМ, 48 ч), затем в свежей среде (72 ч) и/или с CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP, 72 ч).

Основываясь на собственных данных, нами решено использовать оптимальные минимальную и максимальную эффективные дозы QU и CDDP в качестве эталонных значений для QU (15 и 100 мкМ) в течение 24 ч (рис. 8а). Однако было обнаружено, что длительная предварительная инкубация со значительно нетоксичной умеренной дозой (60 мкМ) QU в течение 48 ч оказывает оптимальное влияние на жизнеспособность клеток, позволяя снижать устойчивость клеток SKOV-3/CDDP к CDDP. Так, инкубация с 60 мкМ QU в течение 48 ч, а затем с 5 мкМ CDDP (1/2 IC₅₀) в течение 72 ч значимо приводила к подавлению (снижение на 65%; $p < 0,0001$) жизнеспособности клеток SKOV-3 по сравнению с действием только CDDP (5 мкМ; снижение на 20%) или QU (60 мкМ; снижение на 35%) в отдельности (рис. 7б).

Действие CDDP на клетки SKOV-3/CDDP при 5 мкМ и 10 мкМ не вызывало какого-либо снижения их жизнеспособности, что демонстрирует их устойчивость к CDDP (рис. 8б). Использование МТТ анализа позволило установить снижение количества предобработанных QU клеток при использовании CDDP в концентрации 34 мкМ и 17 мкМ (рис. 8б). Для сублинии SKOV-3/CDDP нетоксичная концентрация CDDP была оптимизирована на уровне 17 мкМ ($1/2 IC_{50}$). Как и в случае с клетками SKOV-3, прединкубация клеток сублинии SKOV-3/CDDP с QU приводила к значительному подавлению выживаемости (65% при концентрации CDDP 17 мкМ в течение 72 ч; $p < 0,005$), по сравнению с действием только CDDP (20%) и QU (35%) (рис. 7б). Эти данные показали, что прединкубация с QU с последующим применением CDDP вызывает эффективное подавление выживаемости в обоих типах клеток рака яичников.

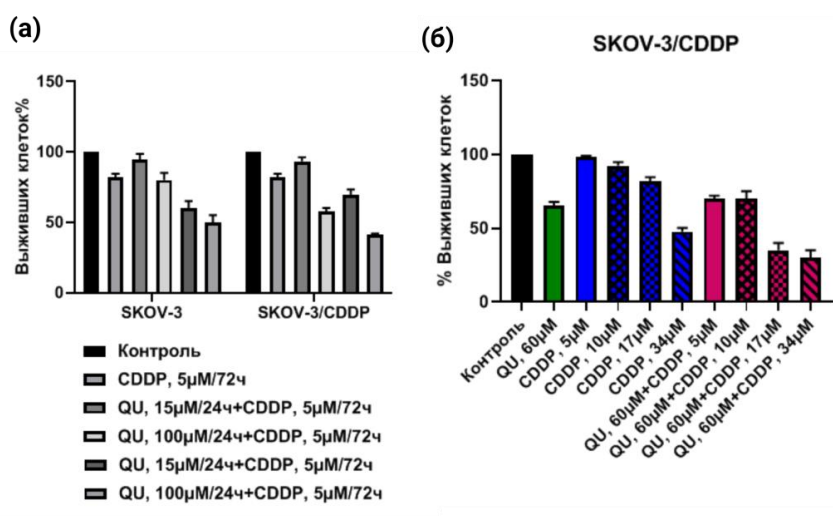


Рис. 8. (а) Влияние прединкубации с QU на эффективность действия CDDP. Оба типа клеток обрабатывали QU (15 или 100 мкМ, 24 ч) с последующей заменой на свежую среду в течение 72 ч или/и с CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP) в течение 72 ч. (б) Влияние прединкубации с QU (60 мкМ, 48 ч) на эффективность действия CDDP. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-анализ.

Влияние кверцетина на клеточный цикл клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

Поскольку цитотоксичность часто сопровождается остановкой клеточного цикла, влияние QU или CDDP в отдельности и в случае прединкубации с QU оценивали с использованием PI-окрашивания для проточной цитометрии (рис. 9). Влияние QU (15 мкМ и 100 мкМ) на клеточный цикл оценено после инкубации в течение 24 ч. Установлено, что при 15 мкМ QU практически не влиял на распределение фаз цикла клеток SKOV-3, однако повышал долю SKOV-3/CDDP клеток в S фазе (рис. 9 а, б).

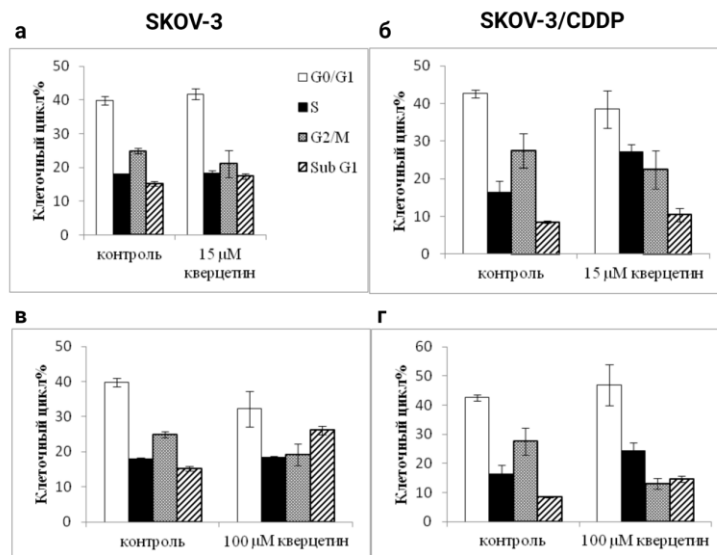


Рис. 9. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 (а, в) и SKOV-3/CDDP (б, г) при действии QU (15 и 100 мкМ, 24 ч), анализируются результаты трёх независимых экспериментов.

Повышение концентрации QU до 100 мкМ приводило к более выраженным изменениям в обеих сублиниях: росту доли гибнущих клеток SKOV-3 (>25% клеток с фрагментированной ДНК; subG1) и значительному накоплению клеток SKOV-3/CDDP в фазах G1 и S (рис 9 в, г).

Таким образом, нарушения клеточного цикла в обеих линиях в ответ на QU различны; эти эффекты зависят от концентрации и выражены как гибель или задержка в той или иной фазе. Анализ клеточного цикла позволил установить, что при действии CDDP при концентрации 5 мкМ вызывает арест клеток SKOV-3 в S-фазе (рис. 10 а), тогда как при более высокой концентрации 17 мкМ наблюдается задержка клеток SKOV-3/CDDP в S и G2/M фазах и их небольшое накопление в суб-G1 в зависимости от времени инкубации (рис. 10 б).

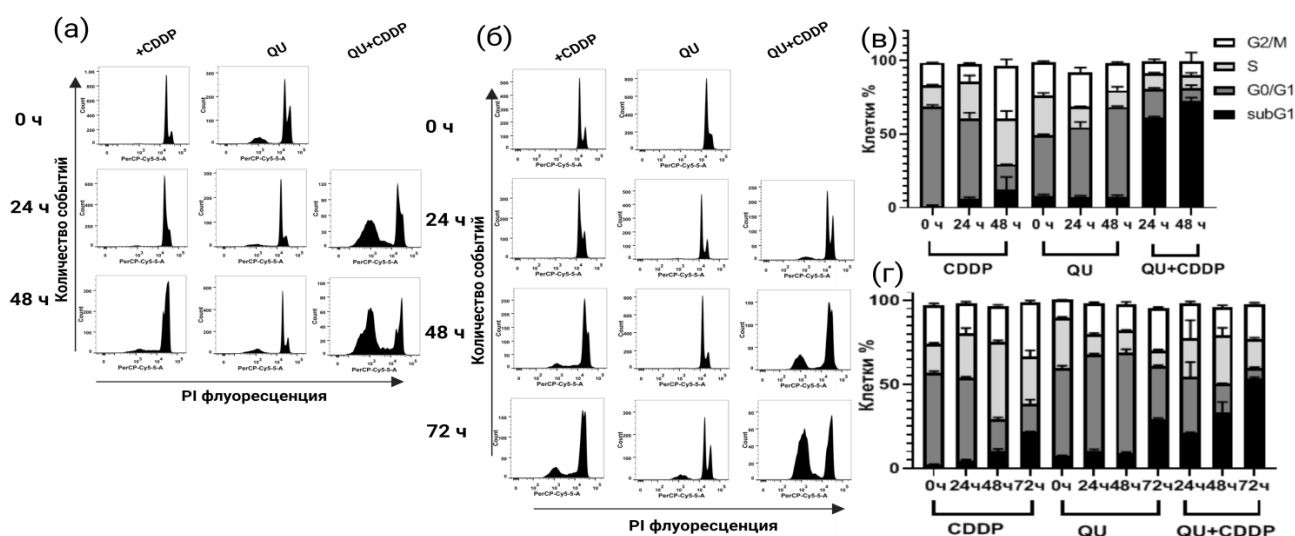


Рис. 10. Прогрессирование клеточного цикла (КЦ) SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, обработанных QU и/или CDDP. Гистограммы распределения КЦ: SKOV-3 (а) и SKOV-3/CDDP (б). Репрезентативные гистограммы распределения фаз КЦ: SKOV-3 (в) и SKOV-3/CDDP (г).

По сравнению с контрольными группами инкубация клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP только с QU приводит к их накоплению в суб-G1 и G2/M фазе зависимым от времени образом (рис. 10), вызывая апоптоз и остановку клеточного цикла в G2/M или S фазах. Для клеток SKOV-3 предварительная обработка QU приводит к значительному повышению их содержания в суб-G1, которое возрастало с $61 \pm 1\%$ через 24 ч до $72,4 \pm 2\%$ через 48 ч (рис. 10 в). Тогда как процент клеток SKOV-3/CDDP в суб-G1 фазе через 72 ч составил только $53,5 \pm 0,7\%$ (рис. 10 г).

Влияние кверцетина на генерацию АФК при действии CDDP на клетки SKOV3/CDDP

Чтобы выяснить, было ли вызвано накопление опухолевых клеток обоих типов в суб-G1 фазе при прединкубации с QU индукцией окислительного стресса, внутриклеточный уровень АФК оценивали с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red (рис. 11).

В ходе исследования нами было предположено, что прединкубация с QU может вызвать более раннюю генерацию АФК. Поэтому мы исследовали изменение уровня АФК в предварительно обработанных опухолевых клетках. Установлено, что инкубация только с QU в течение 24 и 48 ч приводит к снижению уровня АФК по сравнению с контролем в обоих типах клеток (рис. 11). После действия CDDP в течение 4 ч не наблюдалось повышения уровня АФК как в клетках SKOV-3, так и в клетках SKOV-3/CDDP (рис. 11). Через 24 ч инкубации CDDP (рис. 11) вызывал значительное повышение генерации АФК: в 4 раза ($17 \pm 2,9\%$ против $4 \pm 0,3\%$ в контроле) в клетках SKOV-3, тогда как в клетках SKOV3/CDDP — лишь в 2 раза, что может объясняться высоким уровнем антиоксидантной системы в резистентных клетках.

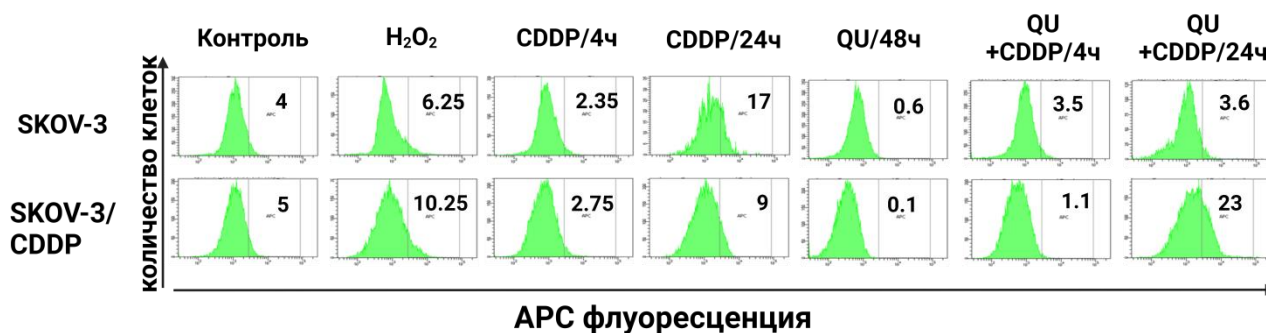


Рис. 11. Оценка АФК методом проточной цитометрии в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии QU и CDDP. Внутриклеточный уровень АФК при инкубации клеток только с QU или CDDP и при прединкубации с QU.

Прединкубация с QU снижала эффект CDDP за счет снижения внутриклеточного уровня АФК до контрольного в клетках SKOV-3 (рис. 11). В клетках SKOV-3/CDDP доля флуоресцентно окрашенных клеток составляла $5 \pm 1\%$ и $9 \pm 1\%$ в необработанных клетках и при действии CDDP, соответственно. Тогда как прединкубация с QU приводила к

значительному повышению сигнала ($23 \pm 1\%$) (рис. 11). Полученные результаты демонстрируют усиление прооксидантного эффекта CDDP при прединкубации с QU. Эти результаты подтверждают, что предварительная обработка QU повышает чувствительность резистентных клеток SKOV-3/CDDP к CDDP, индуцируя генерацию АФК.

Влияние кверцетина на экспрессию генов Trx/TrxR системы, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR

Действие QU (15 и 100 мкМ) в течение 24 ч вызывает также диаметрально противоположное изменение экспрессии генов изоформ Trx и TrxR в чувствительных и резистентных клетках (рис.12). В чувствительных клетках SKOV-3 наблюдается увеличение экспрессии генов TRX1, TRXRД1 и TRXRД2 - в 4, 3,5 и 7 раз при 100 мкМ (рис. 12). Напротив, в резистентных клетках наблюдается резкое снижение экспрессии генов: TRX1, TRX2 -TRXRД1 и TRXRД2 в 1,8, 18,5, 10 и 16 раз при 100 мкМ (рис. 12).

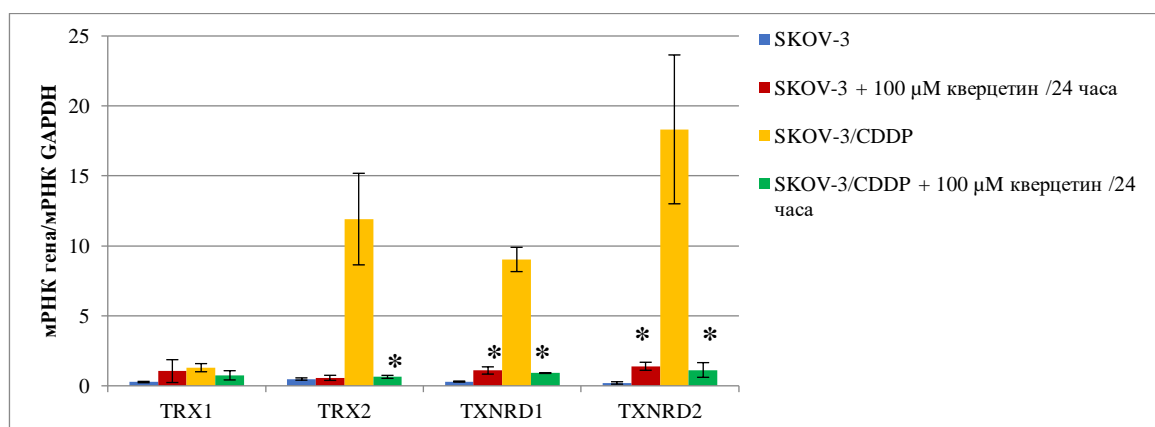


Рис. 12. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (TRX1, TRX2) и TrxR (TRXRД1, TRXRД2) в чувствительных SKOV-3 и резистентных к цисплатину SKOV-3/CDDP клетках после действия кверцетина (100 мкМ) в течение 24 часов.

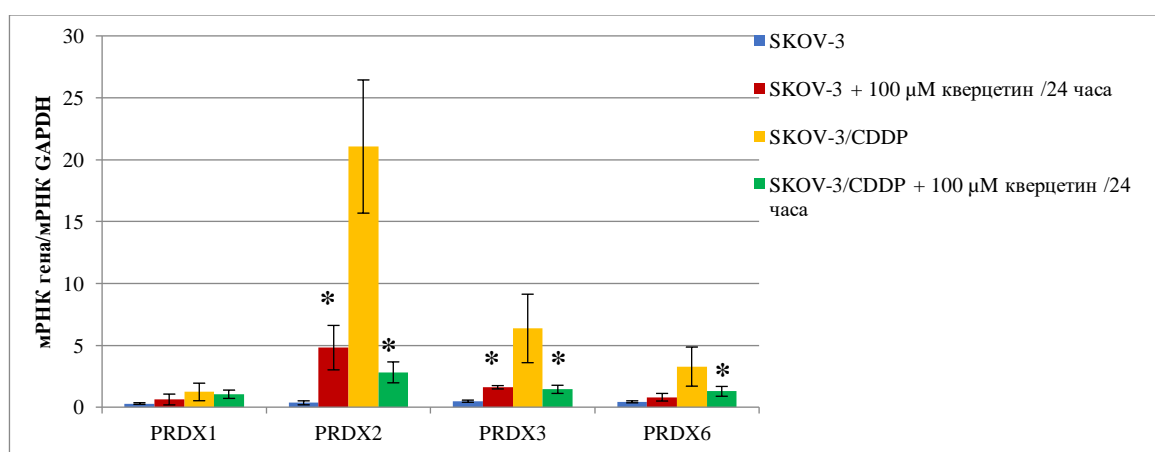


Рис. 13. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6) в чувствительных (SKOV-3) и резистентных к цисплатину (SKOV-3/CDDP) клетках после действия кверцетина (100 мкМ, 24 ч).

Действие QU вызывало аналогичное изменение профиля экспрессии генов изоформ Ptx (PRDX2, PRDX3). Максимальное увеличение экспрессии в клетках SKOV-3 в 14 раз и максимальное ее снижение в клетках SKOV-3/CDDP в 7,5 раза обнаружено у гена PRDX2 под действием 100 мкМ (рис. 13).

Действие QU приводит к повышению экспрессии генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в чувствительных клетках и, наоборот, снижает их экспрессию в резистентных клетках (рис. 14 а). В клетках SKOV-3 экспрессия генов *PI3K*, *AKT*, *MTOR* повышалась в 2, 6,5 и 2 раза при 100 мкМ (рис. 14 а), соответственно. В клетках SKOV-3/CDDP, напротив, наблюдается достоверное снижение экспрессии этих генов.

При действии QU в высокой концентрации (100 мкМ) на чувствительные клетки не наблюдалось достоверного изменения экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и транскрипционного фактора Nrf2, за исключением повышения экспрессии гена *CAT* - в 3,5 раза (рис. 14 б). В резистентных клетках при действии QU (100 мкМ) экспрессия всех генов значительно снижалась (рис. 14 б).

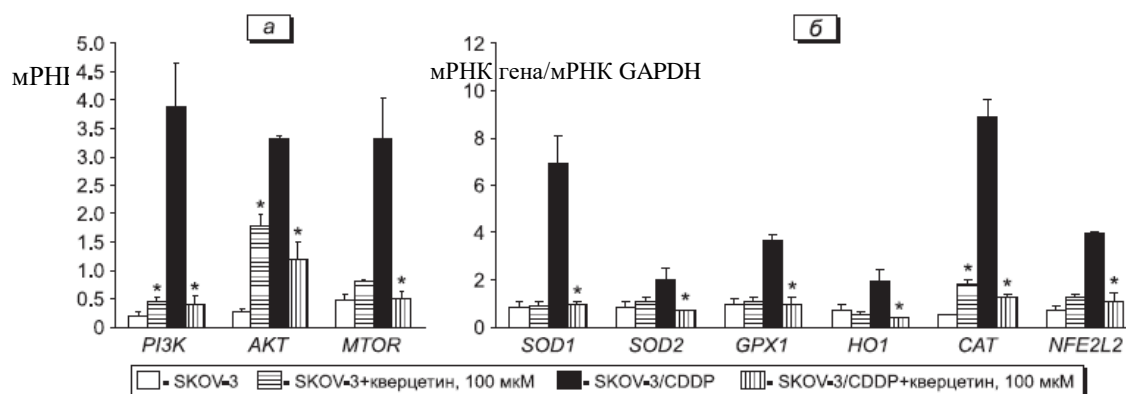


Рис. 14. Влияние кверцетина (100 мкМ, 24 ч) на экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (а), антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *HO-1*) и транскрипционного фактора Nrf2 (б) в клетках SKOV3 и SKOV3/CDDP.

Влияние кверцетина на внутриклеточный уровень белков антиоксидантной системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках SKVO3/CDDP

Для дальнейшего выяснения опосредован ли рост накопления клеток SKOV-3/CDDP в суб-G1 и индукция генерации АФК при прединкубации с QU посредством модуляции антиоксидантной системы и сигнальных путей, было исследовано изменение уровня белков, связанных с чувствительностью к CDDP, с помощью вестерн-блоттинга. Установлено, что уровень антиоксидантной системы Trx/TrxR, а также сигнального пути mTOR/STAT3 был значительно выше в клетках устойчивой сублинии SKOV-3/CDDP по сравнению с родительскими клетками SKOV-3 (рис. 15, а-в).

Проанализирован эффект влияния наиболее эффективной концентрации QU (60 мкМ) с последующим действием CDDP на модуляцию внутриклеточного уровня белков антиоксидантной системы и сигнального пути mTOR/STAT3. По сравнению с индивидуальным действием QU и CDDP, наибольший ингибирующий эффект на клетки

сублинии SKOV-3/CDDP сопровождался изменением в уровне белков после преинкубации с QU (60 мкМ, 48 ч) с последующим действием CDDP (рис. 15 а, б). Внутриклеточные уровни цитозольной и митохондриальной системы Trx/TrxR и активных фосфорилированных форм белков сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках сублинии SKOV-3/CDDP эффективно снижались при предварительной обработке с QU.

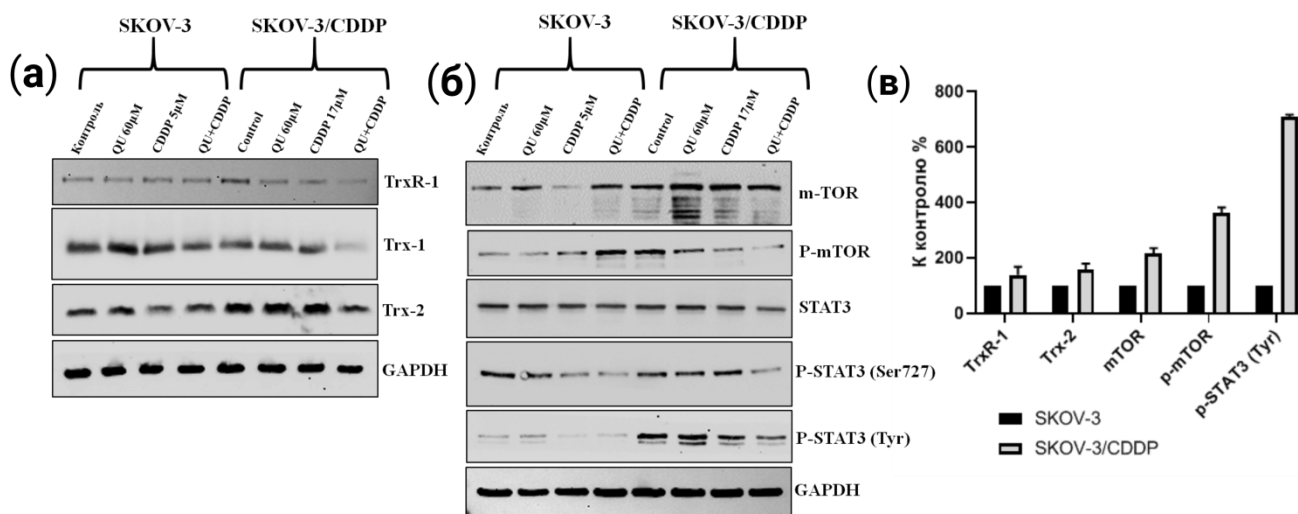


Рис. 15. Вестерн-блоттинг анализ влияния преинкубации с QU на уровень белков в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3. Уровень белков (а) системы Trx/TrxR (б) сигнального пути mTOR/STAT3 (в). Результаты денситометрии: контроль - SKOV-3 и SKOV-3/CDDP. GAPDH использовали в качестве контроля нагрузки. (n = 3).

Влияние кверцетина на митохондриальный путь апоптоза в клеточных линиях SKOV3 и SKVO3/CDDP

Для выяснения вызвано ли ингибирование роста и накопление опухолевых клеток обоих типов в суб-G1 при преинкубации с QU индукцией апоптоза проведена оценка апоптотической гибели клеток с помощью проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания аннексин-V/PI. В отличие от контрольной группы, действие одного CDDP в течение 24 и 48 часов слабо индуцировало апоптоз: $0,9 \pm 0,1$ и $4 \pm 0,6\%$ в клетках SKOV-3 и $2,5 \pm 0,4$ и $2 \pm 0,1\%$ в клетках SKOV-3/CDDP, соответственно. Инкубация только с QU слегка снижало количество живых клеток и незначительно повышало апоптоз - в среднем до $\sim 3 \pm 0,4\%$ и $\sim 1,5 \pm 0,4\%$ у клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, соответственно, по сравнению с необработанными клетками (рис. 16 а, б).

Преинкубация с QU с последующим действием CDDP вызывала индукцию апоптоза с зависимым от времени ростом гибели клеток (рис. 16 а, б). По мере увеличения времени инкубации значения соотношений аннексинV+/PI- (ранняя стадия апоптоза) и аннексинV+/PI+ (поздняя стадия апоптоза) в опухолевых клетках, предварительно обработанных QU, были значительно выше, чем в случае инкубации только с CDDP или QU (рис. 16 а,б). Так, индукция апоптоза составляла примерно $20,3 \pm 3\%$ в клетках SKOV-3, предварительно обработанных QU в течение 48 ч, по сравнению с действием только CDDP

(рис.16 а). Тогда как сенсibilизация клеток SKOV-3/CDDP с помощью QU до введения в среду CDDP существенно повышала процент апоптоза в клетках SKOV-3/CDDP (~ 41,5 ± 2%) по сравнению с действием только CDDP (2 ± 0,1%) через 48 ч (рис. 16 б).

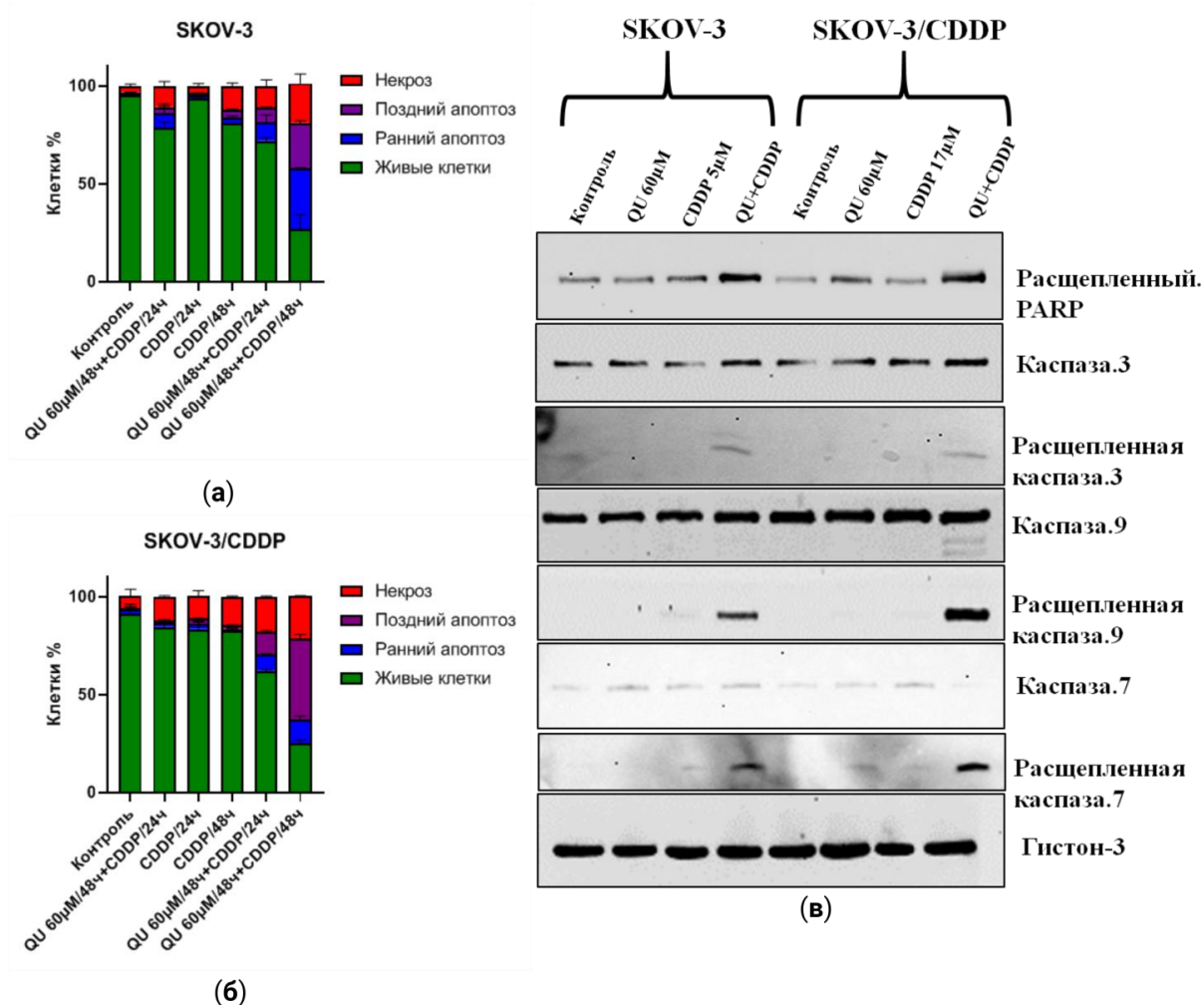


Рис. 16. Апоптоз, индуцированный QU-прединкубацией, в клетках рака яичников. Процент апоптотических клеток SKOV-3 (а) и SKOV-3/CDDP (б) после действия QU, CDDP и прединкубации с QU в течение 24 и 48 часов. (в) Репрезентативный вестерн-блоттинг анализ расщепленных каспаз-9,7,3 и С-PARP в клетках рака яичников, обработанных QU и/или CDDP. В качестве контроля загрузки использован гистон-3. (n = 3).

Для дальнейшего выявления механизмов апоптотического процесса, вызванного действием QU, CDDP или прединкубации с QU, мы оценили внутриклеточный уровень специфических белков-маркеров апоптоза (расщепленная каспаза-9,7,3 и расщепленный PARP) с помощью вестерн-блоттинга в обоих типах клеток. Уровни расщепленных каспаз-9, -7 и -3, а также расщепленного PARP в обоих типах клеток увеличивались только в случае прединкубации с QU (рис. 16 в). Полученные результаты демонстрируют, что гибель клеток опосредована ингибированием пути mTOR/STAT3 и стимуляцией АФК-опосредованной активации каспаз-3, -7 и -9.

Оценка влияния куркумина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину. Влияние куркумина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDD

Следующий этап работы был связан с исследованием действия на редокс-зависимые механизмы лекарственной устойчивости другого ингибитора TrxR – куркумина (рис. 17 а).

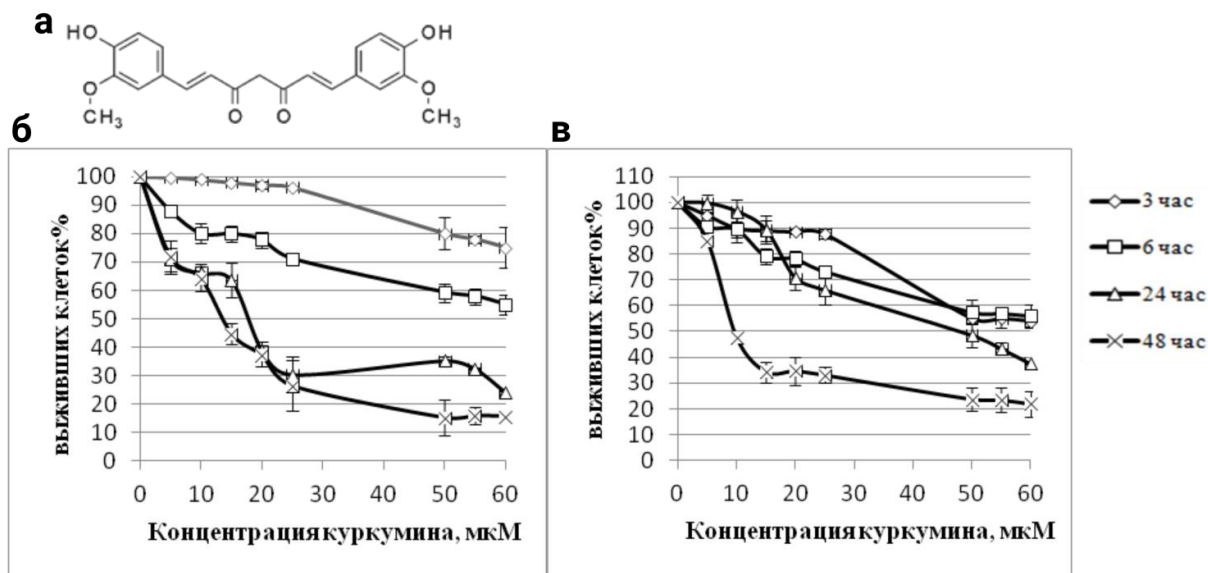


Рис. 17. Влияние куркумина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к цисплатину клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации (3, 6, 24 и 48 ч).

Нами установлено, что действие куркумина (рис. 17 а) вызывает зависимое от концентрации и времени инкубации снижение жизнеспособности как родительских, так и устойчивых к CDDP клеток SKOV-3 (рис. 17 б,в).

Влияние куркумина на клеточный цикл клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

При концентрации 17 мкМ (значение IC_{50} для клеток SKOV-3) в течение 24 ч куркумин нарушает распределение фаз цикла: достоверно увеличивается доля клеток в G2/M по сравнению с необработанными клетками (рис. 18).

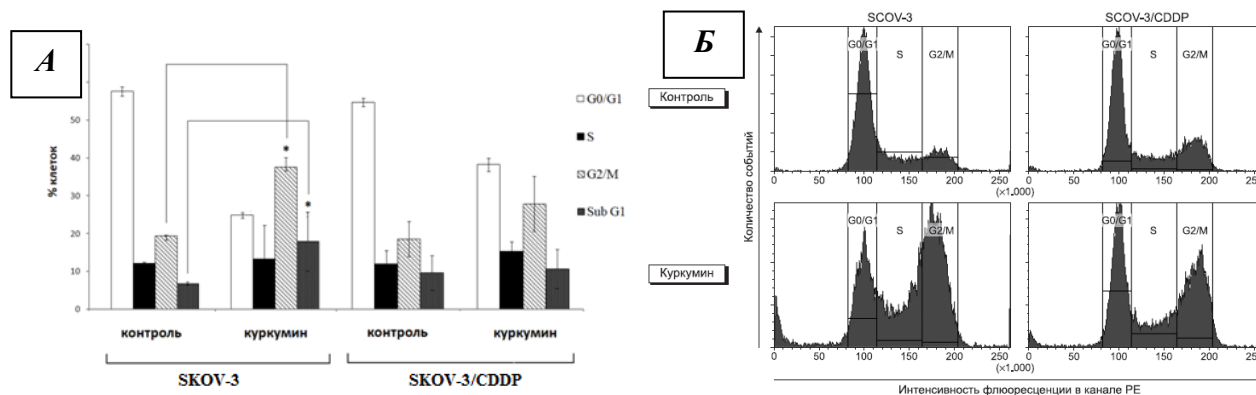


Рис. 18. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии куркумина (17 мкМ, 24 ч). а — доля клеток в каждой фазе. б — гистограммы интенсивности флуоресценции йодида пропидия (PI); представлены результаты одного из трёх независимых экспериментов со схожими результатами.

Однако этот эффект по-разному реализуется: для SKOV-3 доля гибнущих клеток (subG1) нарастает, тогда как у SKOV-3/CDDP задержка в G2/M не сопровождается повышением доли клеток в subG1.

Влияние куркумина на экспрессию генов Trx/TrxR системы, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR

С целью исследования влияния куркумина на редокс-зависимые пути лекарственной устойчивости к цисплатину клеток SKOV-3, следующий этап работы включал оценку его влияния на экспрессию генов Trx/TrxR системы. При высокой концентрации куркумина (17 мкМ) в резистентных клетках происходит резкое снижение их экспрессии: *TRX2* - в 7.5 раз, *TRXR* (*TRXR**D1*, *TRXR**D2*) – в 8 и 11 раз, соответственно (рис. 19).

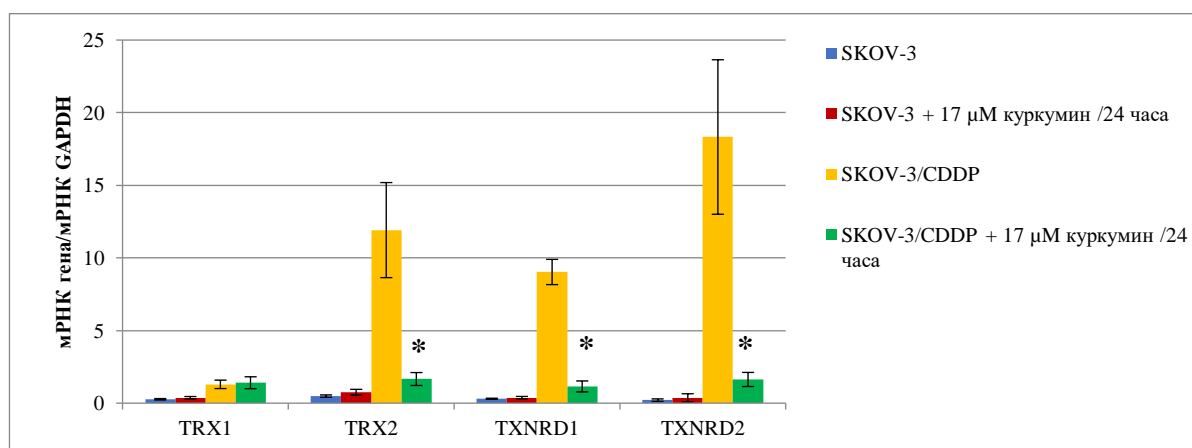


Рис. 19. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (TRX1, TRX2) и TrxR (TRXR D1, TRXR D2) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках после действия куркумина (17 мкМ) в течение 24 ч.

Действие куркумина вызывало аналогичные изменения профиля экспрессии генов изоформ Prx (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX6*), которые также наблюдались при действии QU. При этом максимальное повышение экспрессии в клетках SKOV-3 и максимальное её снижение в клетках SKOV-3/CDDP обнаружены у гена *PRDX2* под действием 17мкМ куркумина (рис.20).

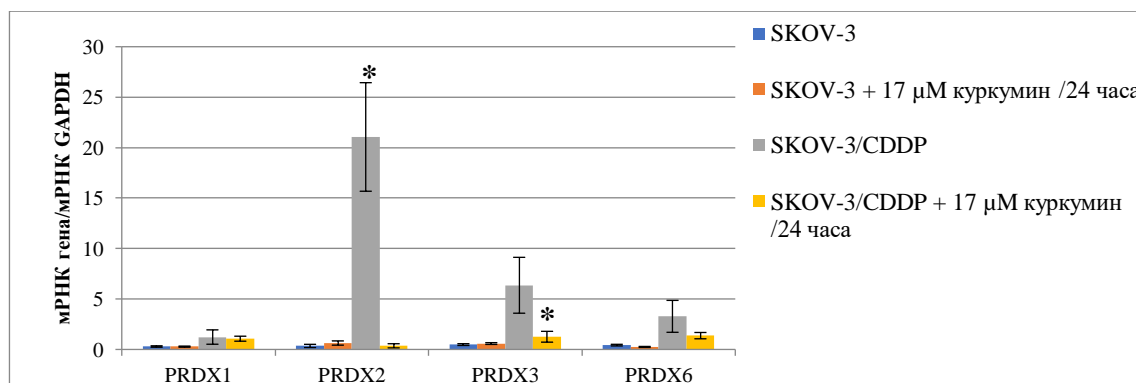


Рис. 20. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках после действия куркумина (17 мкМ) в течение 24 ч.

В клетках SKOV-3 установлен рост экспрессии гена PI3K, в 2 раза под действием 17мкМ куркумина, тогда как экспрессия гена AKT практически не менялась (рис.21), экспрессия гена MTOR оставалась без изменений. В клетках SKOV-3/CDDP наблюдается, напротив, значительное снижение экспрессии генов PI3K, AKT, MTOR: в 3, 5 и 6.5 раз при действии 17мкМ куркумина (рис.21 а). При окислительном стрессе ядерная транслокация Trx1 активирует фактор транскрипции Nrf2 контролирующий ферментативные, так и неферментативные антиоксидантные системы (Bellezza et al. 2018; Ryoо et al. 2018). При 17 мкМ куркумина не обнаружено достоверного изменения экспрессии этих генов, за исключением небольшого снижения экспрессии гена SOD2 (рис. 21 б).

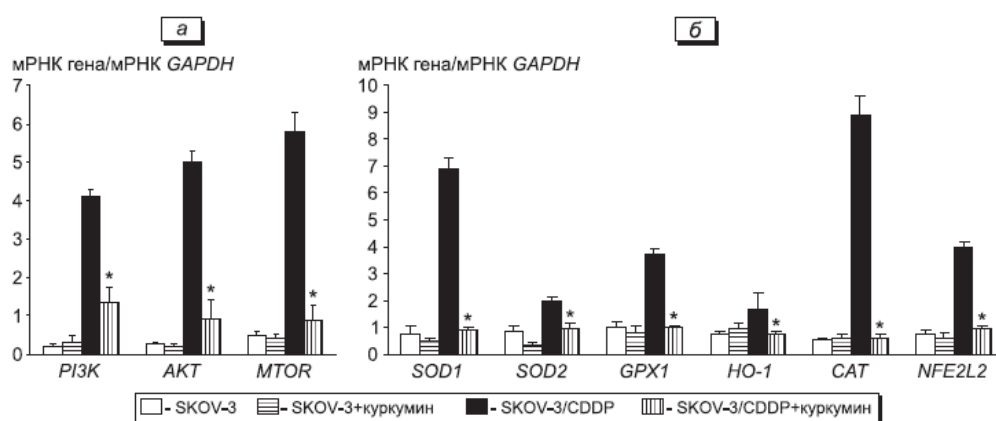


Рис. 21. Влияние куркумина (17 мкМ, 24 ч) на экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (а) и ключевых антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *HO-1*), транскрипционного фактора Nrf2 (б) в чувствительных SKOV3 и резистентных SKOV3/CDDP клетках.

В отличие от родительских клеток у резистентной сублинии при обеих концентрациях куркумин снижал уровень мРНК как ключевых антиоксидантных ферментов SOD1, SOD2, GPX1, HO1, CAT, так и транскрипционного фактора Nrf2. Таким образом, действие куркумина вызывает снижение антиоксидантной защиты в резистентных опухолевых клетках и подавление сигнального пути PI3K/AKT/mTOR (рис. 21 а, б).

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Формирование устойчивости к цисплатину у клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 сопровождается повышением экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR.
2. В резистентных клетках действие необратимых ингибиторов TrxR - куркумина и кверцетина, вызывает значительное снижение экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов, киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR и транскрипционного фактора Nrf2.

3. Кверцетин и куркумин повышают чувствительность резистентных клеток к цисплатину.
4. Прединкубация резистентных клеток с кверцетином, с последующей обработкой цисплатином снижает уровень белков ферментов системы Trx/TrxR, усиливает генерацию активных форм кислорода при действии цисплатина.
5. Прединкубация клеток с кверцетином, с последующей обработкой цисплатином вызывает накопление резистентных клетках SKOV-3/CDDP в sub-G1 фазе клеточного цикла, инициируя митохондриальный апоптоз путем активации расщепления каспаз 9, 7, 3 и PARP и подавления фосфорилирования белков сигнального пути mTOR/STAT3.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Публикации в изданиях, индексируемых наукометрическими базами данных Scopus и Web of Science:

1. **Hasan Aseel Ali**, Kalinina Elena, Nuzhina Julia, Volodina Yulia, Shtil Alexander, and Tatarskiy Victor. Potentiation of Cisplatin Cytotoxicity in Resistant Ovarian Cancer SKOV3/Cisplatin Cells by Quercetin Pre-Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24, 10960.
2. **Hasan Aseel Ali**, Tatarskiy Victor and Kalinina Elena. Synthetic Pathways and the Therapeutic Potential of Quercetin and Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(22):14413.
3. **Hasan Aseel Ali**, Kalinina Elena, Tatarskiy Victor and Shtil Alexander. The Thioredoxin System of Mammalian Cells and Its Modulators. *Biomedicines*. 2022, 10, 1757.
4. **Hasan Aseel Ali**, Kalinina Elena, Tatarskiy Victor, Volodina Yulia, Petrova Albina, Novichkova Maria, Zhdanov Dmitry and Shtil Alexander. Suppression of the Antioxidant System and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Cisplatin-Resistant Cancer Cells by Quercetin. *Bull Exp Biol Med* 173, 760–764 (2022).
5. Kalinina Elena, **Hasan Aseel Ali**, Tatarskiy Victor, Volodina Yulia, Petrova Albina, Novichkova Maria, Zhdanov Dmitry, Nurmuradov Nurmurad, Chernov Nikolai N, and Shtil Alexander. Suppression of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Antioxidant System and Reversal of Cancer Cells Resistance to Cisplatin under the Effect of Curcumin. *Bull Exp Biol Med*. 2022;173(3):371-375.
6. Kalinina V Elena, **Hasan Aseel Ali**, Tatarskiy Victor, Petrova Albina, Novichkova Maria, Nurmuradov Nurmurad, Shtil Alexander. Trx/TrxR system in redox-dependent regulation of cisplatin resistance in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2023; 201:55-56.
7. Elena Kalinina, **Aseel Ali Hasan**, Albina Petrova, Dmitry Zhdanov, Jing Feng, Maria Novichkova, Nurmurad Nurmuradov, Victor Tatarskiy, Alexander Shtil, Nikolai N. Chernov. Quercetin facilitates cell chemosensitivity in cisplatin resistant cancer cells through inhibition of Trx/TrxT/Prx system and PI3K/Akt/mTOR signaling. //Free Radical Biology and Medicine, 2021, Vol. 177, Suppl. 1, P. S111-S112.
8. Kalinina E.V., **Hasan A.A.**, Alsaidi A.H., Petrova A.S., Andreev Y.A., Lubova K.V., Shtil A.A., Chernov N.N. TrxR/Trx/Prx System and Redox-Dependent Changes under Development of Cancer Drug Resistance. //FEBS Open Bio, 2021, Vol. 11, Suppl. 1, P 485 (P-08.5-25).
9. Kalinina Elena, **Hasan Aseel Ali**, Petrova Albina, Novichkova Maria, Zhdanov Dmitry, Shtil Alexander, Chernov Nikolai. Effect of Curcumin on Gene Expression of Trx/TrxR System and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in SKOV-3 Cells Resistant to Cisplatin //Free Radical

Biology and Medicine, 2020, Vol. 159 Suppl. 1, P. S55. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.148.

10. Kalinina Elena, **Hasan Aseel Ali**, Alsaidi Ahmed, Andreev Yaroslav, Shtil Alexander. Redoxins and Redox-dependent Changes under Development of Cancer Drug Resistance. //Free Radical Biology and Medicine, 2020, Vol. 159 Suppl. 1, P. S55-56. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.149.
11. E. Kalinina, Y. Andreev, K. Lubova, **A. A. Hasan**, A. Petrova, N. Chernov, A. Shtil, M. Novichkova, N. Nurmuradov. Thioredoxin/thioredoxin reductase system and redox-dependent regulation of adaptive antioxidant response under formation of cancer cell resistance to cisplatin. // FEBS Open Bio. – 2019. – Vol. 9. - № S1. – P. 333. DOI: 10.1002/2211-5463.12675

Публикации в других изданиях

12. **Хасан А.А.Ш.**, Калинина Е.В., Татарский В.В., Володина Ю.Л., Петрова А.С.,Новичкова М.Д., Жданов Д.Д., Нурмурадов Н.К., Чернов Н.Н. Штиль А.А. Подавление клеточного редокс-статуса, сигнального пути PI3K-AKT-mTOR и преодоление резистентности опухолевых клеток к цисплатину при действии куркумина Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (БИОКАТАЛИЗ-2023), Суздаль, Россия, (25-29 июня 2023), с. 182.
13. **Хасан А.А.**, Калинина Е.В., Татарский В.В., Жданов Д.Д., Петрова А.С., Новичкова М.Д., Штиль А.А. Обращение устойчивости опухолевых клеток к цисплатину при действии куркумина и кверцетина и модуляция экспрессии генов ферментов, контролирующего редокс-статус. //Успехи молекулярной онкологии. 2021. Т. 8. № S4. С. 156-157.

Список сокращений и условных обозначений

QU – кверцетин

CUR-куркумин

CDDP-цисплатин

Trx - тиоредоксин

TrxR - тиоредоксинредуктаза

SKOV-3 – линия клеток аденокарциномы яичника человека

SKOV-3/CDDP – сублиния аденокарциномы яичника человека, устойчивая к цисплатину

Ptx - пероксиредоксин

PI3K - фосфоинозитид-3-киназа

PI – пропидий йодид

MDR - множественная лекарственная устойчивость

P-gp - P-гликопротеин

Хасан Асиль Али Шехадех (Иордания)

ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА И КВЕРЦЕТИНА НА ТИОРЕДОКСИН-ЗАВИСИМУЮ СИСТЕМУ И УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ

Среди ферментных систем антиоксидантной защиты для предотвращения окислительного стресса важную роль выполняет система тиоредоксин-тиоредоксинредуктазы (Trx/TrxR). Являясь главным регулятором окислительно-восстановительных процессов, Trx/TrxR система связана с пролиферацией и выживанием клеток. Сверхэкспрессия системы Trx/TrxR, антиоксидантных ферментов, транскрипционного фактора Nrf2 и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR способствуют резистентности к цисплатину клеток яичников SKOV-3/CDDP.

Установлено, что «обращение» резистентности яичников опухолевых клеток к цисплатину, вызываемое куркумином и кверцетином, ингибиторами TrxR, связано с подавлением экспрессии генов ферментов Trx/TrxR системы – изоформ тиоредоксина (*TRX1*, *TRX2*) и тиоредоксинредуктазы (*TRXDR1*, *TRXDR2*), пероксиредоксинов (*PRDX1,2,3* и *6*), антиоксидантных ферментов (*SOD-1*, *SOD-2*, *Gpx-1*, *CAT* и *HO-1*) и фактора транскрипции *NFE2L2*. Установлен эффект противоположного действия куркумина и кверцетина на антиоксидантный статус и сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR и mTOR/STAT3 в чувствительных и резистентных опухолевых клетках. Исследован редокс-зависимый механизм модуляции устойчивости к цисплатину. Предварительная обработка QU вызывала апоптоз в зависимости от времени. В этом исследовании механизма действия выяснилось, что предварительная обработка QU действует как прооксидант, который индуцирует выработку АФК путем ингибирования антиоксидантной системы Trx/TrxR. Более того, предварительная обработка QU показала активацию митохондриального апоптотического пути (расщепленные каспазы 9, 7, 3 и PARP) посредством подавления сигнального пути (mTOR/STAT3) в клетках SKOV-3/CDDP. Это исследование предоставляет новые данные о механизмах, повышающих чувствительности резистентных клеток к цисплатину.

Hasan Aseel Ali Shehadeh (Jordan)

INFLUENCE OF CURCUMIN AND QUERCETIN ON THE THIOREDOXIN-DEPENDENT SYSTEM AND TUMOR CELL RESISTANCE TO CISPLATIN

Thioredoxin (Trx/TrxR) system plays an important role among antioxidant defense enzymatic systems against oxidative stress. Trx/TrxR system is also associated with cell proliferation and survival. The overexpression of Trx/TrxR system, antioxidant enzymes, transcription factor Nrf2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway contribute to the cisplatin resistance of SKOV-3/CDDP ovarian cells.

Curcumin and quercetin, as irreversible TrxR inhibitors, have been shown to sensitize cisplatin-resistant cell lines to cisplatin through suppression of gene expression of the Trx/TrxR system enzymes – thioredoxin (*TRX1*, *TRX2*) and thioredoxin reductase (*TRXDR1*, *TRXDR2*) isoforms, peroxiredoxin (*PRDX1,2,3* and *6*) antioxidant enzymes (*SOD-1*, *SOD-2*, *Gpx-1*, *CAT* and *HO-1*), and transcription factor *NFE2L2* that control cell redox status. The pro-antioxidant effect of curcumin and quercetin on the antioxidant status and the PI3K/AKT/mTOR and mTOR/STAT3 signaling pathways in sensitive and resistant ovarian cancer cells was studied. A redox-dependent mechanism of modulation of tumor cell resistance to cisplatin was also evaluated. QU pre-treatment induced sub-G1 phase cells accumulation (apoptosis) in a time-dependent manner. In this study of mechanism of actions revealed that QU pre-treatment acts as pro-oxidant that induces ROS production by inhibiting thioredoxin antioxidant system Trx/TrxR. Moreover, QU pre-treatment has shown activation of mitochondrial apoptotic pathway (cleaved caspases 9, 7, 3 and cleaved PARP) through downregulation of signaling pathway (mTOR/STAT3) in SKOV-3/CDDP cells. This study provides some more new data for the mechanism by which the QU pre-treatment re-sensitizes SKOV-3/CDDP cells to cisplatin.