

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса
Лумумбы»

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Калинина Е.В.

кандидат биологических наук

Татарский В.В.

Москва – 2023

Оглавление

Оглавление.....	2
Сокращения и условные обозначения.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель и задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Методология и методы исследования.....	11
Положения, выносимые на защиту.....	11
Личный вклад автора.....	12
Степень достоверности и апробация результатов.....	12
Структура и объем работы.....	13
Публикации.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Окислительный стресс и антиоксидантные ферментные системы.....	14
1.2. Система Trx/TrxR.....	17
1.2.1. Изоформы тиоредоксина Trx1 и Trx2. Структура и каталитическая функция.....	17
1.2.2. Изоформы тиоредоксинредуктазы TrxR1 и TrxR2. Структура и каталитическая функция	20
1.3. Роль Trx/TrxR в сигналинге.....	22
1.3.1. Экстраклеточная система Trx/TrxR.....	22
1.3.2. Внутриклеточная система Trx/TrxR.....	23

1.3.2.1. Цитозольная и митохондриальная системы Trx/TrxR. Роль в механизме апоптоза	23
1.3.2.2. Ядерная система Trx/TrxR.....	24
1.4. Регуляция Trx/TrxR системы.....	26
1.4.1. Ингибиторы Trx/TrxR.....	26
1.4.1.1. Ингибирование Trx/TrxR металлокомплексами.....	30
1.4.1.2. Ингибирование Trx/TrxR халькоген- и мышьякорганическими соединениями.....	31
1.4.1.3. Ингибирование Trx/TrxR природными соединениями. Полифенолы.....	31
1.4.1.3.1. Флавоноиды.....	32
1.4.1.3.2. Кверцетин.....	33
1.4.1.3.3. Куркуминоиды.....	34
1.4.1.3.4. Куркумин.....	35
1.5. Окислительно-восстановительные свойства и биологические эффекты кверцетина и куркумина.....	35
1.5.1. Антиоксидантные и прооксидантные свойства.....	35
1.5.2. Противоопухолевые эффекты.....	38
1.6. Комбинации с противоопухолевыми препаратами.....	45
1.7. Баланс систем Trx/TrxR и GSH/Grx в норме и при патологии.....	46
1.8. Роль Trx/TrxR в опухоли.....	47
1.9. Система TrxR/Trx при лекарственной устойчивости опухолей.....	50
1.10. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR.....	52
1.10.1. Роль в регуляции клеточных процессов. Связь с внутриклеточным уровнем АФК.....	52
1.10.2. Лекарственная устойчивость опухоли за счет гиперактивированной онкогенной передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR.....	55
Глава 2. Материалы и методы.....	60
2.1. Реактивы.....	60

2.2. Культуры клеток. Условия культивирования.....	60
2.3. Оценка цитотоксичности (МТТ-тест.).....	60
2.4. Оценка клеточного цикла.....	61
2.5. Оценка внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК).....	62
2.6. ПЦР в режиме реального времени(Real-time RT-PCR).....	63
2.7. Вестерн-блоттинг анализ	65
2.8. Оценка апоптотической гибели клеток.....	66
2.9. Статистический анализ.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	68
3.1. Оценка редокс-системы при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину.....	68
3.1.1. Оценка Trx/TrxR системы (изоформ Trx, TrxR, Prx) в резистентных клетках SKOV-3/CDDP.....	68
3.1.2. Оценка экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR при формировании устойчивости к цисплатину в SKOV-3 клетках.....	70
3.2. Оценка влияния кверцетина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину.....	72
3.2.1. Влияние кверцетина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP.....	72
3.2.2. Влияние кверцетина на клеточный цикл клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP.....	76
3.2.3. Влияние кверцетина на генерацию АФК при действии CDDP на клетки SKVO3/CDDP.....	81

3.2.4. Влияние кверцетина на экспрессию генов Trx/TrxR системы, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.....	83
3.2.5. Влияние кверцетина на внутриклеточный уровень белков антиоксидантной системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках SKVO3/CDDP.....	85
3.2.6. Влияние кверцетина на митохондриальный путь апоптоза в клеточных линиях SKOV3 и SKOV3/CDDP.....	88
3.3. Оценка влияния куркумина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину.....	90
3.3.1. Влияние куркумина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP.....	90
3.3.2. Влияние куркумина на клеточный цикл клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP.....	91
3.3.3. Влияние куркумина на экспрессию генов Trx/TrxR системы, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.....	93
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	96
Заключение.....	106
Выводы.....	108
Список использованной литературы.....	109
Благодарности.....	160

Сокращения и условные обозначения

АФК – активные формы кислорода

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

CDDP – цисплатин

Grx – глутаредоксин

Cur – куркумин

DOX – доксорубицин

GPx – глутатионпероксидаза

GSH – восстановленный глутатион

NOX - НАДФН-оксидаза

Nrf2 - ядерный фактор эритроидного происхождения 2-подобный 2

PDI – протеиндисульфидизомераза

P-gr - P-гликопротеин

PI - пропидий йодид

PI3K - фосфоинозитол-3-киназа

PIP3 - фосфатидилинозитол (3,4,5) -трисфосфат

Prx - пероксиредоксин

QU – кверцетин

SOD1 - цитоплазматическая Cu/ZnSOD

SOD2 - митохондриальная MnSOD

STAT3 - сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT

Trx - тиоредоксин

TrxR - тиоредоксинредуктаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Наиболее распространенной причиной смерти среди женщин, связанной со злокачественными гинекологическим новообразованиями, является рак яичников [179]. Общая 5-летняя выживаемость составляет менее половины заболевших женщин [266, 53]. Стандартная терапия рака яичников включает циторедуктивную операцию с последующим назначением адъювантной химиотерапии препаратами на основе платины, включая цисплатин (CDDP) [30]. Однако развитие резистентности к CDDP является серьезным препятствием для радикальной терапии рака [164]. Феномен лекарственной устойчивости может развиваться посредством нескольких механизмов, в том числе за счет усиления систем детоксикации лекарственных средств и их активных метаболитов [226, 318]. Развитие окислительного стресса в ответ на прооксидантное действие CDDP также играет заметную роль в развитии резистентности к CDDP при раке яичников [24].

Регуляция уровня антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов является необходимой стратегией для предотвращения развития окислительного стресса [310]. В число наиболее известных механизмов формирования лекарственной устойчивости в настоящее время включаются редокс-зависимые пути регуляции [35].

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 [125, 268, 326]. В антиоксидантной системе защиты клеток наряду с ключевыми антиоксидантными ферментами большое значение имеет тиоредоксин(Trx)-зависимая система, участвующая редокс-зависимой регуляции посредством контроля тиол-дисульфидного обмена [19, 106, 201]. 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 [213, 320].

Одним из возможных подходов обращающих развитие лекарственной резистентности, может быть использование модуляторов системы тиол-дисульфидного обмена, позволяющих менять состояние клеточного редокс-статуса. В этой связи, актуальным является исследование механизма преодоления лекарственной устойчивости соединениями из класса полифенолов, ингибирующих Trx-зависимую систему. Среди полифенолов куркумин и кверцетин продемонстрировали антиоксидантную активность путем модуляции систем Trx/TrxR, а также показали противораковую активность в отношении различных линий опухолевых клеток за счет остановки клеточного цикла и запуска митохондриального апоптотического пути, а также за счет модуляции сигнальных путей [90].

Степень разработанности темы исследования

Trx-зависимая система включает дисульфидредуктазу тиоредоксин (Trx) и ФАД-зависимую тиоредоксинредуктазу (TrxR). Восстановленный Trx 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 Trx, образуется его окисленная форма, восстановление которого осуществляется НАДФН(H^+)-зависимая TrxR [106, 156].

Многочисленные исследования посвящены изучению роли Trx-зависимой системы в онкогенезе. Гиперэкспрессия цитоплазматической, так и митохондриальной изоформ TrxR (TrxR1, TrxR2) обнаружены при раках молочной железы, легких, полости рта, плоскоклеточный рак [26, 107]. Гиперэкспрессия генов изоформ Trx в опухолевых клетках направлена на утилизацию избыточного количества АФК и тесно связана со степенью развития

опухолевого процесса [240]. Значительна роль Тгх-зависимой системы в активности редокс-зависимого сигналинга [313].

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 [113, 114]. Более того, глутаредоксин как тиолоксидоредуктаза и вторая антиоксидантная система катализирует процессы восстановления дисульфида и участвует в редокс-зависимой регуляции клеточной сигнализации [236].

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 [131, 271]. 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 [103].

Цель и задачи исследования

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 (*TRXDRI*, *TRXDRI2*), контролирующей 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 работы

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.

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.

Положения, выносимые 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*), контролирующих 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), контролирующих окислительно-восстановительный статус клеток, и сигнального пути mTOR/STAT3, что сопровождается усилением генерации активных форм кислорода и активацией митохондриального апоптоза.

Личный вклад автора заключался в самостоятельном проведении анализа имеющихся литературных данных, планировании, подготовке и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных, в участии в подготовке публикаций и докладов на конференциях по теме диссертационной работы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической значимостью и их сопоставлением с актуальными литературными данными. Результаты работы представлены на международных конференциях:

1. 44th FEBS Congress “From Molecules to living Systems” (Krakow, Poland, 6-11 July, 2019).
2. 45th FEBS Congress “Molecules of Life: Towards New Horizons“ (Ljublyana, Slovenia, 3-8 July, 2021).
3. SFRR-E 2021 Annual meeting “Redox Biology in the 21st Century: A New Scientific Discipline”, (Belgrade, Serbia, 15-18 June, 2021).
4. SfRBM 27th Annual Conference (Virtual platform of SfRBM, USA, 18-20 November, 2020).
5. SfRBM 28th Annual Conference (Virtual platform of SfRBM, USA, 15-18 November, 2021).
6. VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 22-24 декабря, 2021).
7. 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (БИОКАТАЛИЗ-2023), Суздаль, Россия, (25-29 июня 2023).

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.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 13 научных работ, в т.ч. 12 публикаций в ВАК/РУДН/МБЦ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Окислительный стресс и антиоксидантные ферментные системы

Окислительный стресс – состояние нарушения клеточного редокс гомеостаза, связанное с повышенной генерацией и накоплением активных АФК, которые являются побочными продуктами аэробного дыхания и извлечения энергии [60]. К АФК относятся свободные радикалы, такие как супероксид анион радикал ($O_2^{\bullet-}$) и гидроксильный радикал ($\bullet OH$), а также нерадикальные молекулы, такие как перекись водорода H_2O_2 и синглетный кислород 1O_2 , которые представляют собой частично восстановленные формы молекулярного кислорода (O_2) [247]. В физиологических условиях клетки млекопитающих производят низкие уровни АФК, чтобы опосредовать разнообразные физиологические реакции, включая рост, миграцию и дифференцировку. Генерация повышенного уровня АФК может вызвать повреждение ДНК, белков и липидов и привести к гибели клеток, развитию патологий и/или старению. Чтобы избежать или регенерировать повреждение макромолекул, вызванное АФК, необходимо поддержание сбалансированных окислительно-восстановительных условий [92].

Для защиты от летального накопления АФК в клетке эволюционно развились различные системы антиоксидантной защиты, включая систему ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза/каталаза), систему Trx/TrxR, глутатион-зависимую систему (GSH/глутатионпероксидаза/глутатион-S-трансфераза). Как ферментативные, так и неферментативные антиоксиданты регулируются контролирующим их ядерным фактором транскрипции Nrf2, который транслоцируется в ядро в ответ на окислительный стресс (рис. 1) [265]. Исходным продуктом дыхательной цепи митохондрий является супероксид анион ($O_2^{\bullet-}$), который в основном генерируется комплексами I и III и затем может быстро преобразован в H_2O_2

неферментативно или с помощью супероксиддисмутазы [132] с последующим восстановлением до воды каталазой или глутатионпероксидазой. У млекопитающих существуют три изоформы SOD: цитоплазматическая Cu/ZnSOD (SOD1), митохондриальная MnSOD (SOD2) и внеклеточная Cu/ZnSOD (SOD3), каждая из которых требует иона металла (Cu^{2+} или Mn^{2+}) для своей активации [73].

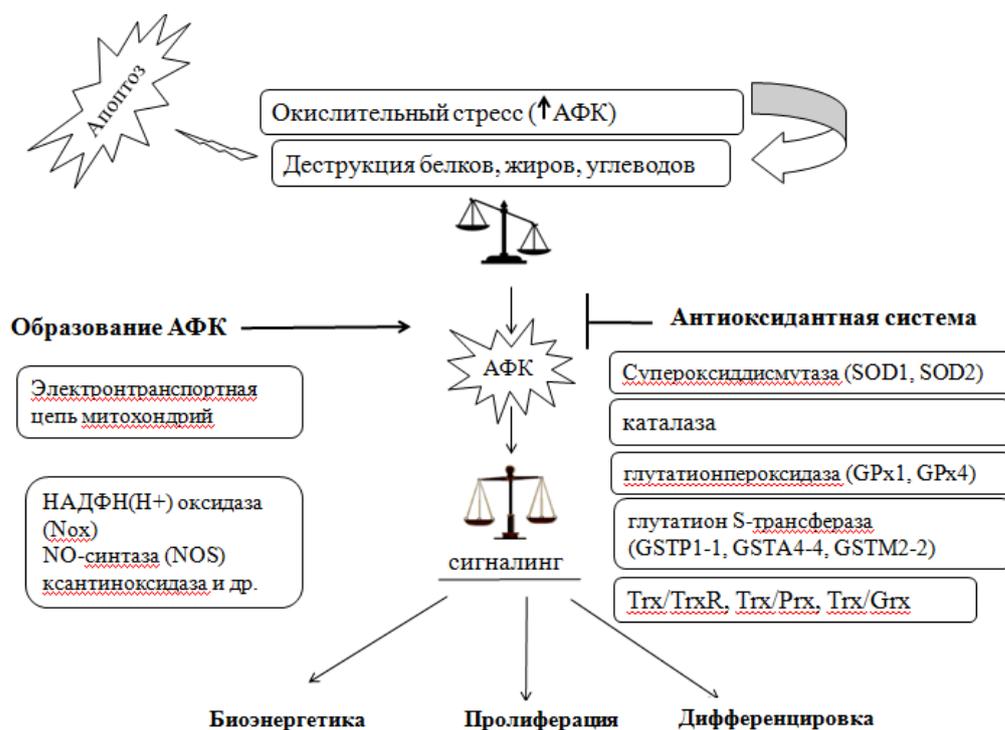


Рис. 1. Баланс прооксиданты/антиоксиданты и развитие окислительного стресса.

Каталаза - антиоксидантный фермент, содержащий гем, широко распространён практически во всех клетках. Высокая экспрессия гена каталазы отмечается в пероксисомах, где каталаза защищает клеточные структуры от повреждающего действия H_2O_2 , продуцируемого пероксисомальной оксидазой [148, 280].

Входящие в антиоксидантную систему пероксиредоксины и глутатионпероксидазы представляют собой два филогенетически близких

семейства ферментов, восстанавливающих гидропероксиды [241]. Пероксиредоксин (Prx) представляет собой суперсемейство пероксидаз на основе тиола, которые экспрессируются во всех таксономических категориях на ходе эволюции [175, 216]. В зависимости от структуры и расположения остатков Cys в активном центре шесть изоформ Prxs млекопитающих можно разделить на три подгруппы: типичные 2-Cys Prxs (Prx1–4), атипичные 2-Cys Prxs (Prx5) и 1-Cys Prxs (Prx6) [124].

Все изоформы Prx содержат консервативный остаток Cys, который претерпевает редокс изменение между тиоловым и дисульфидным состояниями [216]. Prxs обладают широкой субклеточной локализацией. Изоформы Prx-1 и Prx-2 экспрессируются преимущественно в цитозоле [124], тогда как Prx-3 и Prx-5 локализируются исключительно в митохондриях [56]. Благодаря наличию N-концевого сигнального пептида изоформа Prx-4 может секретироваться из клетки [262].

Изоформы Prx участвуют в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза и иммунного ответа [85]. Антиоксидантные свойства Prxs связаны с активностью системы Trx/TrxR, модулируя окислительно-восстановительный статус тиоредоксина и выступая в качестве важного медиатора редокс-зависимой передачи сигналов [216]. Восстановленный Trx восстанавливает окисленную форму Prx, что способствует снижению уровня АФК за счет активности восстановленного Prx, разлагающего H_2O_2 [198]. В случае 1-Cys Prxs (изоформа Prx6) в восстановлении окисленной формы Prx происходит с участием GSH [70]. Митохондриальный Prx-3 является субстратом как для Trx-2, так и для Grx-2 с одинаковой каталитической эффективностью за счет механизма дитиоловой реакции, тогда как митохондриальный Prx-5 ограничен системой Trx2 [86].

Некоторые изоформы семейства глутатионпероксидазы (GPx) содержат 21-ю аминокислоту селеноцистеин (Sec), которая входит в активный центр. Благодаря своим физико-химическим свойствам Sec считается лучшим

катализатором разложения пероксидов, чем цис-содержащие ферменты [215]. При физиологическом pH Se присутствует в ионизированной форме из-за более низкого pKa (5,4), чем у тиольной группы Cys (8,6), что делает его лучшим нуклеофилом. В своей окисленной форме (в виде селеновой кислоты) Se является лучшим электрофилом, чем сульфеновая кислота.

Семейство GPx восстанавливает гидропероксиды до соответствующих спиртов (воды в случае H₂O₂), используя GSH в качестве косубстрата. У млекопитающих GPx включает восемь изоформ (GPx1–8), пять из которых у человека являются селенопротеинами (GPx1–4 и Gpx6). Остальные три изоформы содержат вместо селеноцистеина (Sec) цистеин. GPx1, 2, 3, 5 и 6 являются гомотетрамерами, а GPx4 - мономер. GPx2 играет двойную роль в канцерогенезе в зависимости от способа инициации и стадии рака. Изоформа GPx3 ассоциирована с мембраной. GPx4 играет роль в регуляции апоптоза и, вместе с GPx5, - в мужской фертильности. Изоформа GPx6 обнаружена в обонятельном эпителии, где она, предположительно, играет важную роль в анализе запахов. Следует отметить, что изоформа GPx6 человека и свиньи содержат Sec в активном центре, тогда как активный сайт GPx6 мыши и крысы содержит Cys. Недавно обнаруженные Cys-содержащие изоформы GPx7 и GPx8 связаны с эндоплазматическим ретикулумом и образуют комплексы с протеин-дисульфид изомеразой (PDI) и Trx в реакции дитиол-дисульфидного обмена, что препятствует агрегации белков [32].

1.2. Система Trx/TrxR

1.2.1. Изоформы тиоредоксина Trx1 и Trx2. Структура и каталитическая функция

У млекопитающих система Trx играет важную роль в защите клеточных структур от действия АФК [192]. Белки с Trx-подобный доменом, содержащим редокс-активный мотив C-X-X-C, образуют суперсемейство белков, связанных с тиол-дисульфидным обменом, обнаруженным практически у всех таксономических групп [78, 157]. Наиболее представительный член этого

семейства Trx - белок массой 12 кДа, который обнаружен у бактерий, растений, животных и человека [303]. Трехмерные структуры Trx разных видов (в частности, семейство Trx *E. coli* и *Chlamydomonas Reinhardtii*) установлены с помощью рентгеновской кристаллографии [167, 191], тогда как структуры как окисленных, так и восстановленных состояний Trx (*Ehrlichia chaffeensis*) - с помощью ЯМР [34].

Базовый мотив Trx-домена состоит из трех α -спиралей, окружающих центральное ядро, состоящее из четырех β -листов [138, 169]. Помимо основной складки, сам Trx имеет дополнительный β -лист и α -спираль на N-конце [138]. В центральной области пять β -цепей окружены четырьмя α -спиралями. β -листы и α -спирали складки Trx можно разделить на N-концевые $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$ и C-концевые $\beta_4\beta_5\alpha_4$ мотивы, соединенные петлей остатков, включающих α_3 -спираль. β -цепи N-концевого мотива идут в одном направлении, тогда как две β -цепи C-концевого мотива антипараллельны друг другу. Спирали α_2 и α_4 выстраиваются параллельно в одном направлении на листе, в то время как α_3 проходит вдоль противоположной стороны β -нитей и перпендикулярно другим спиральям [52, 169].

В клетках млекопитающих охарактеризованы два основных типа Trx (ЕС 1.8.4.8), которые различаются внутриклеточной локализацией, тканеспецифическими паттернами экспрессии и субклеточной структурой: цитозольная Trx-1 и митохондриальная Trx-2 изоформы. Хотя Trx-1 в основном локализуется в цитозоле, он может мигрировать в ядро при нитрозативном/окислительном стрессе [180] или секретироваться из клетки [182], в то время как Trx-2 - жизненно важная редокс-зависимая изоформа митохондрий [44]. Как изоформа Trx-1, так изоформа Trx-2 характеризуются консервативной последовательностью активного центра Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (WCGPC) [195]. Два остатка Cys32 и Cys35 в активном центре (необходимые для каталитической активности Trx) легко окисляются и подвергаются обратимой окислительно-восстановительной реакции между окисленным

дисульфидом (-S-S-) и восстановленным дитиолом (-SH, -SH) [138, 216]. Другие консервативные остатки не являются строго обязательными для активности фермента, но определяют термодинамические и окислительно-восстановительные свойства белка [52].

Предполагаемый механизм реакции восстановления дисульфида белка включает несколько этапов. Во-первых, восстановленный Trx нековалентно связывается с окисленным дисульфидсодержащим белковым субстратом через консервативную гидрофобную поверхность, окружающую активный центр Trx [144]. рКа ~ 7 N-концевого цистеина активного центра существенно ниже, чем рКа свободных остатков цистеина в растворе [71]. В физиологических условиях большая часть серы в N-концевом цистеине присутствует в виде тиолата, реакционноспособной депротонированной формы тиола. Этот тиолат может действовать как нуклеофил, взаимодействуя с различными субстратами, что приводит к образованию межмолекулярного смешанного дисульфида (Trx-S-S-белок) и высвобождению свободного тиола [128]. Напротив, высокое рКа ~ 9 C-концевого цистеина способствует его существованию в виде тиола. C-концевой тиол должен быть активирован как тиолат, чтобы облегчить следующий этап реакции, на котором образуются полностью восстановленный целевой белок и дисульфид-содержащий Trx [52, 144]. Восстановление окисленного Trx катализирует НАДФН(H^+)-зависимая TrxR [52].

Помимо двух остатков цистеина в активном центре Trx-1 млекопитающих содержит дополнительные консервативные остатки цистеина (в положениях 62, 69 и 73 Trx-1 человека), которые не обнаруживаются в митохондриальном Trx-2 млекопитающих или в Trx других видов [65, 195]. Cys62 и Cys69 погружены внутри белка и лежат на обоих концах короткой $\alpha 3$ -спирали, тогда как Cys73 находится на гидрофобном участке у поверхности белка [284]. Эти дополнительные остатки цистеина участвуют в активности Trx млекопитающих в зависимости от их редокс состояния; например, дисульфид неактивного сайта, образующийся между Cys62 и Cys69, ингибирует активность Trx-1 для редокс-

зависимой передачи сигналов в условиях окислительного стресса [284]. S-нитрозилирование Trx по Cys69 необходимо для элиминации АФК и сохранения редокс-зависимой регуляторной активности, что способствует антиапоптотическим функциям белка [81].

Помимо каталитической активности и участия в редокс-зависимых путях регуляции Trx обладает шапероноподобными свойствами, которые важны для укладки и ренатурации белков после действия стресса. Trx способствует функциональной укладке цитратсинтазы и α -глюкозидазы после денатурации мочевины и укладке рецептора галактозы в *E. coli* [120]. In vitro обе изоформы табачных пластид Trxs f и m способствуют реактивации безцистеиновой формы химически денатурированной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и предотвращают термическую агрегацию малатдегидрогеназы [229]. Цитозольный Trx сои обладает той же активностью, что и молекулярный шаперон для белков матрикса пероксисом [63]. Обнаружено, что Trx-2 из *Trypanosoma brucei* действует как молекулярный шаперон, предотвращая агрегацию белков, вызванную зависимыми от температуры структурными изменениями [57]. По сравнению с Trx-1 подробная информация о структуре и функции Trx-2 все еще недостаточна. Установлена кристаллическая структура Trx-2 из устойчивой к стрессу бактерии *Deinococcus radiodurans* (DrTrx-2), у которой обнаружено N-концевое расширение, которое образует домен цинкового пальца с двумя мотивами CXXC [123].

1.2.2. Изоформы тиоредоксиредуктазы TrxR1 и TrxR2. Структура и каталитическая функция

TrxR (EC 1.6.4.5) представляет собой гомодимерный селеноцистеин-содержащий флавопротеин, который катализирует НАДФН(H^+)-зависимое восстановление Trx [29]. Trx и TrxR образуют антиоксидантную систему Trx для поддержания клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза [29, 106]. Субъединица 55 кДа обнаружена преимущественно у млекопитающих, тогда как субъединица 35 кДа - у бактерий, растений, архей и большинства

одноклеточных эукариот [228]. У млекопитающих каждый мономер TrxR включает FAD в качестве простетической группы, сайт связывания НАДФН(Н⁺) и окислительно-восстановительный активный сайт, содержащий дитиол/дисульфидный мотив. Установлено, что аминокислотная последовательность плацентарной TrxR человека только на 31% идентична TrxR прокариот [75].

Каталитический сайт -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- TrxR человека расположен в домене FAD, тогда как соответствующий сайт TrxR *E. coli* -Cys-Ala-Thr-Cys- является частью домена, связывающего НАДФН(Н⁺) [278, 312]. С-конец TrxR млекопитающих имеет консервативный Gly-Cys-SeCys-Gly, содержащий SeCys в качестве еще одного каталитического активного центра, который необходим для восстановления Trx и других субстратов, включая глутаредоксин 2 (Grx-2), PDI, селенит, витамин С и цитохром с, а также такие препараты, как мотексафин гадолиний и аллоксан. Широкая субстратная специфичность TrxR млекопитающих обусловлена его гибким С-концевым хвостом и высокой реакционной способностью пары SeCys, которая не обнаружена у ее бактериальных аналогов [163, 185].

У млекопитающих есть три изоформы TrxR – цитозольная и ядерная TrxR-1, митохондриальная TrxR-2 и TrxR-3, известная как тиоредоксинглутатионредуктаза, TGR. TrxR-3 экспрессируется только в семенниках [13]. Изоформы кодируются тремя отдельными генами: TNXRD1, TNXRD2 и TNXRD3 соответственно. TrxR-1 и TrxR-2 человека тесно связаны, демонстрируя 56% идентичности и 84% сходства первичной аминокислотной последовательности. Однако TrxR-2 отличается от TrxR-1 наличием N-концевого остатка из 33 аминокислот, который обладает характерными свойствами сигнальной последовательности для митохондриальной транслокации [174].

Первый этап восстановительной полуреакции TrxR включает восстановление ФАД с помощью НАДФН(Н⁺) в одной субъединице, а затем

ФАДН₂ переносит восстанавливающие эквиваленты на N-конец (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys), при этом Cys59 и Cys64 образуют мотив активного центра и восстанавливают дисульфид до дитиоловой пары. Эта N-концевая дитиольная пара далее отдает электроны С-концевому селененилсульфиду (Cys497–SeCys498) другой субъединицы и восстанавливает его до пары селенолтиола. Эта восстановленная С-концевая пара селенолтиола действует как второй окислительно-восстановительный центр; электроны переносятся от редокс-активного дисульфида через редокс-центр на С-конце к субстратам TrxR, таким как окисленный Trx, глутаредоксин 2, PDI и небольшим молекулам, например, селенитам, перекиси водорода, дегидроаскорбату, липоевой кислоте, убихинону, цитохром с, аллоксан и мотексафин гадолиний [13, 15].

1.3. Роль Trx/TrxR в сигналинге

1.3.1. Экстраклеточная система Trx/TrxR

Изоформа Trx-1 в основном локализуется в цитозоле, но может секретироваться из клеток в двух формах: полноразмерном Trx-1 и усеченной форме, называемой Trx-80. Последний не обладает редокс активностью, но стимулирует мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) [151, 202]. Хотя в Trx1 отсутствует классический сигнальный пептид, он экспортируется во внеклеточную среду по независимому от ЭПР/Гольджи пути (также называемому нетрадиционной или неклассической секрецией). Точный механизм секреции Trx1 неясен.

На сегодняшний день не выявлено специфических рецепторов клеточной поверхности для экстраклеточного Trx [165, 235, 303], однако известно, что он является аутокринным фактором роста для Т-лимфотропного вируса-1 человека и В-лимфоцитов, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра [277], а также действует как цитокин и хемокин для иммунных клеток [141, 144]. Повышение уровня экстраклеточного Trx обнаружено при многих патологических состояниях, связанных с окислительным стрессом. Так, внеклеточный тиоредоксин (Etrx3/REQ_13520) необходим для устойчивости

актинобактериального патогена *Rhodococcus equi* к окислителям [183]. Появляется все больше доказательств того, что внеклеточный Trx также играет роль в иммунном ответе благодаря своей способности избирательно распознавать дисульфид C46–C99 IL-4, тем самым инактивируя цитокиновую активность в клетках эритролейкемии TF-1 [206].

Экстраклеточный Trx стимулирует пролиферацию опухолевых клеток [187, 208]. Механизм его действия предполагает увеличение продукции цитокинов (IL-1, IL-2 и TNF α), а также индукцию факторов роста и связанных с пролиферацией транскрипционных факторов [208].

Кроме того, Trx был идентифицирован как белок, ассоциированный с липидным рафтом (LR) [163]. LR, микродомены плазматической мембраны, содержат сфинголипиды и холестерин [109, 250], которые способны образовывать мембранные макродомены, контролировать окислительно-восстановительное состояние молекул клеточной поверхности и влиять на нижестоящие сигнальные пути [109, 303]. В частности, мутант Trx-C35S, у которого Cys35 активного сайта заменен серином, быстро связывался с поверхностью клетки и интернализировался LR-зависимым образом. Это указывает на то, что остаток цистеина в активном сайте Trx играет фундаментальную роль в интернализации внеклеточного Trx посредством LR [126].

1.3.2. Внутриклеточная система Trx/TrxR

1.3.2.1. Цитозольная и митохондриальная системы Trx/TrxR. Роль в механизме апоптоза

Остатки Cys32 и Cys35 Trx-1 необходимы для индукции убиквитинирования и деградации ASK1 [153]. Обнаружено, что модификация остатков Cys Trx-1 человека п-бензохиноном приводит к диссоциации комплекса Trx1-ASK1 с последующей активацией ASK1, пути p38/MAPK и апоптоза [246]. Кроме того, действие TAT-2GTP1 (производное биотинилированного пептида 2GTP1) избирательно нарушает взаимодействие

Trx1-ASK1, что приводит к активации ASK1 путем фосфорилирования, последующей активации JNK и снижению жизнеспособности опухолевых клеток [119]. Trx2, связываясь с митохондриальной ASK1, вызывает активацию JNK-независимого пути апоптоза. Trx1 и Trx2 связываются с ASK-1 по Cys250 и Cys30 в N-концевом регуляторном домене соответственно [317]. Следует отметить, что сигнальный путь Trx2-ASK1 играет регуляторную роль в митохондриально-индуцированном апоптозе во время прогрессирования *Pemphigus vulgaris* [285].

Мощным негативным регулятором Trx является белок, взаимодействующий с Trx – Trxnip (также называемый Trx-связывающим белком-2; TBP-2), который специфически связывается с восстановленным Trx. Взаимодействие между Trx и Trxnip включает образование дисульфидной связи между восстановленным Trx и Trxnip Cys247 [305]. Это взаимодействие позволяет разрушить комплекс Trx1-ASK1 и реактивировать активность ASK1, что, в свою очередь, индуцирует апоптоз через JNK- и p38-зависимые каскады [97]. Так, система Trx/TrxR регулирует ASK1/JNK/p38/surviving-зависимый путь апоптоза во время ишемически-реперфузионного повреждения яичек (tIRI) [6].

Эффекторные (эксекторные) каспазы апоптоза (каспазы 3, 6, 7), включают семейство цистеиновых протеаз [189], активность которых зависит от остатков Cys в активном центре. Так, Trx может подавлять апоптоз, катализируя S-нитрозирование прокаспазы-3 и каспазы-3 в клетках Jurkat [176]. Показано, что в физиологических условиях восстановленный Trx1, но не Trx2, взаимодействует через остатки Cys своего активного центра с фактором, индуцирующим апоптоз (AIF), подавляя AIF-опосредованное повреждение ДНК путем модуляции взаимодействия AIF-ДНК, тогда как в условиях окислительного в условиях стресса взаимодействие между Trx1 и AIF нарушается [243].

1.3.2.2. Ядерная система Trx/TrxR

В условиях нитрозативного/окислительного стресса Trx-1 мигрирует в ядро. Это явление связано с выживанием клеток [180]. Как и АФК, активные

формы азота могут вызывать нитрозативное повреждение. Оксид азота (NO) синтезируется посредством окисления L-аргинина тремя изоформами NO-синтазы: эндотелиальной (eNOS), индуцибельной (iNOS) и нейрональной (nNOS) [245]. NO является важным регулятором ряда процессов, включая свертывание крови, воспаление и клеточную адгезию. Значимая роль NO отмечается в развитии нейродегенеративных заболеваний и злокачественных новообразований [76].

В условиях нитрозативного стресса механизм ядерной миграции Trx-1, вызываемый нитрозотиолом и S-нитрозо-N-ацетилпеницилламином, тесно связан с сигнальным путем p21Ras-ERK1/2. В результате нитрозилирования p21Ras и активации MAP-киназ ERK1/2 Trx-1 накапливается в ядре за счет подавления Txnip. Ядерная транслокация Trx1 (рис. 2) приводит к активации факторов транскрипции, связанных с выживанием и пролиферацией клеток [180, 194].

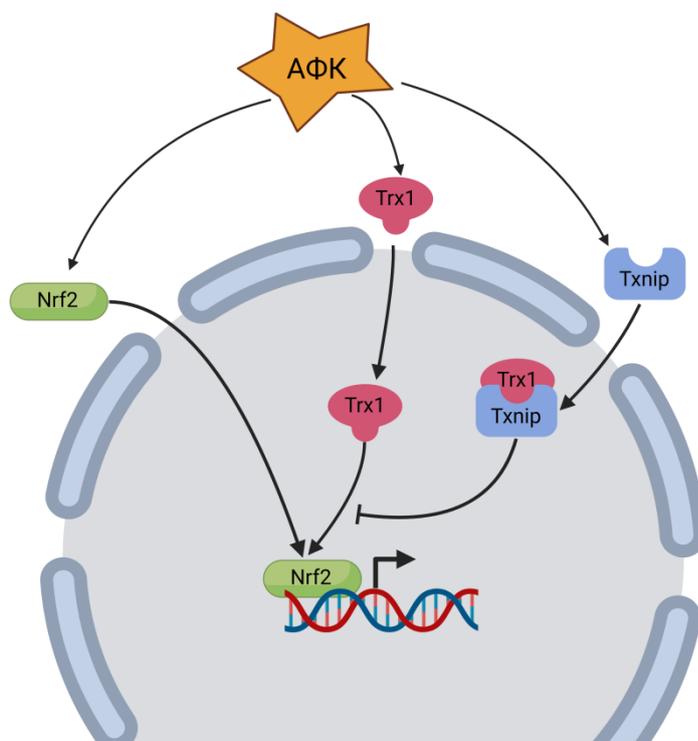


Рис. 2. Транслокация Trx-1 из цитоплазмы в ядро после воздействия окислительного стресса. Ядерная транслокация Trx1 активирует фактор

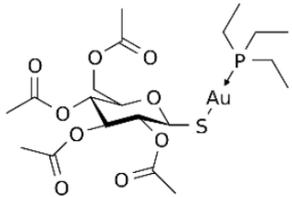
транскрипции Nrf2. Активность Trx-1 ингибируется Txnip. Nrf2 может регулировать транскрипцию различных групп генов-мишеней, контролирующих редокс гомеостаз (*NQO1, HO1, GCLC, GCLM, GSR1, GPX2, PRDX1, PRDX6, SLC7A11, TXN, TXNRD1, TXNIP и SRX1*), метаболизм пентозофосфатного пути и образование НАДФН(H⁺) (*G6PDH, ME1, PGD, IDH1*), процессы детоксикации (*AKR1B3, GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTP1, PGD, PTGR1, MRP4, MRP5*), обмен белка (*PSMA1, PSMB5, SQSTM1*).

1.4. Регуляция Trx/TrxR системы

1.4.1. Ингибиторы Trx/TrxR

Гиперэкспрессия генов Trx/TrxR наблюдается при многих злокачественных новообразованиях (см. ниже). В связи с этим растет интерес к поиску и разработке ингибиторов Trx/TrxR, обладающих потенциальной противоопухолевой активностью [87, 178]. Zhang с соавторами среди ингибиторов TrxR выделили четыре класса: 1 - металлсодержащие ингибиторы (Au, Pt, Sn, Ru, Rho, La, Si, Fe); 2 - натуральные продукты и их синтетические аналоги (фенилпропаноиды и полифенолы, хиноновые соединения, терпеноиды, нитромочевины и хромены); 3 - Se-, S-, Te- и As-содержащие соединения; 4 - разные ингибиторы [312, 315]. Химические структуры ингибиторов и полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC₅₀) суммированы в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Комплексы золото-N-гетероциклический карбен (NHC)-Au-Cl и ауранофин как ингибиторы TrxR крысы [233].

Химическая формула	Структура	IC ₅₀ , нМ
2,3,4,6-тетра-о-ацетил-тио-βD-глюкопиранозато-S-(триэтилфосфин)золото (ауранофин)		0,016

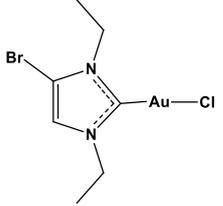
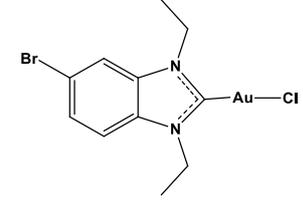
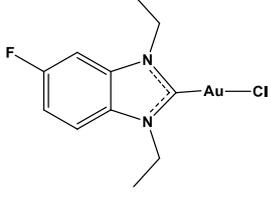
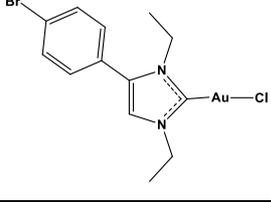
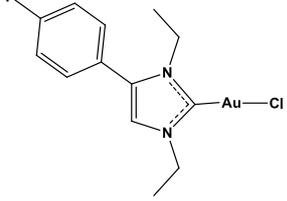
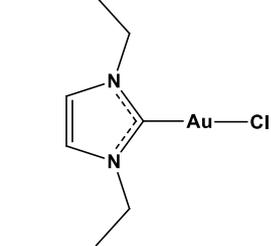
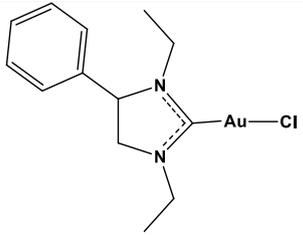
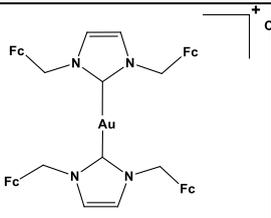
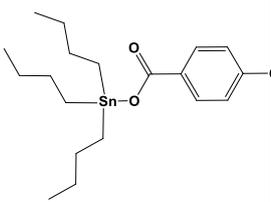
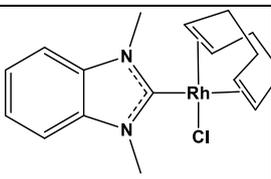
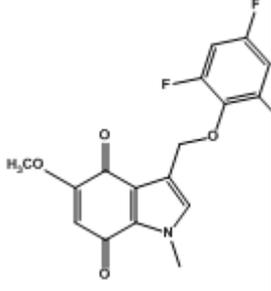
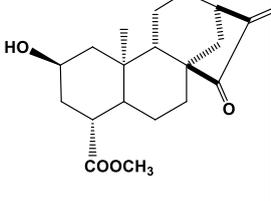
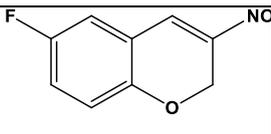
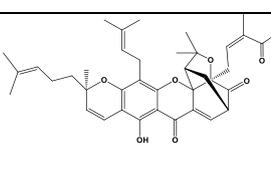
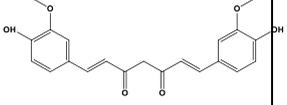
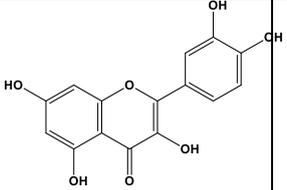
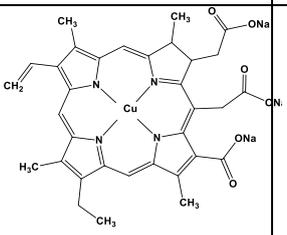
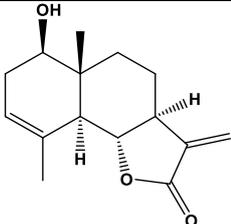
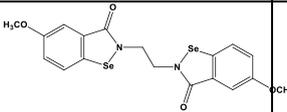
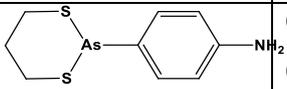
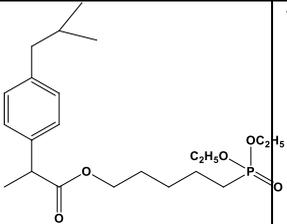
Хлорид (4-бром-1,3-диэтилимидазол-2-илиден) золото(I)		0.038
Хлорид (5-бром-1,3-диэтилбензимидазолий-2-илиден) золото(I)		0.042
Хлорид (1,3-диэтил-5-фторбензимидазол-2-илиден)золото(I)		0.043
Хлорид [4-(4-бромфенил)-1,3-диэтилимидазол-2-илиден]золото(I)		0.098
Хлорид [1,3-диэтил-4-(4-фторфенил)имидазол-2-илиден]золото(I)		0.174
Хлорид (1,3-диэтилимидазол-2-илиден)золото(I)		0.209
Хлорид (1,3-диэтил-4-фенилимидазол-2-илиден)золото(I)		0.244

Таблица 2. Цитотоксичность ингибиторов TrxR.

—	Классификация	Соединение	Структура	IC ₅₀ (мкМ)	Линия	Ссылка
---	---------------	------------	-----------	------------------------	-------	--------

					КЛЕТОК	
	1.1. Золото-N-гетероциклические карбеновые комплексы	бис(1,3-ди(ферроценилметил)имидазол-2-илиден)-золото(I), хлорид	 Fc= Ферроцен	0.14 ± 0.03 0.19 ± 0.01 0.12 ± 0.01 0.48 ± 0.15	A549 A2780 2780CP PC-3	[12]
	1.2. Оловоорганические ингибиторы	карбоксилат три-n-бутилолова (IV)		0.97 ± 0.01 0.13 ± 0.03	HT-29 MCF-7	[188]
	1.3. Ингибиторы N-гетероциклических карбеновых комплексов родия (I)	хлорид(η ² ,η ² -циклоокта-1,5-диен)(1,3-диметилбензимидазол-2-илиден)-родия(I)		0.6 ± 0.2 0.9 ± 0.0	MCF-7 HT-29	[193]
2. Натуральные продукты и их синтетические аналоги	2.1. Соединения хинона (индолехиноны)	5-метокси-1-метил-3-[(2,4,6-трифторфенокси)метил]индол-4,7-дион		0.035/4h 0.018/72h	MIA PaCa-2	[300]
	2.2. Терпеноиды (производные атрактилигенина)	метиловый эфир 15-этоатрактилигенина (SC2017).		1.68 ± 0.11	Jurkat	[55]
	2.3. Нитромочевины и хромены (производные 3-нитро-2H-хромена)	6-фтор-3-нитро-2H-хромен		1.42	A549	[292]
	2.4. Гамбогиновая кислота	гамбогиновая кислота		~0.7	SMMC-7721	[66]

	2.5. Дикетонные соединения	куркумин		11.2 6.03 11.6 5.5 6.4	A549 H1299 H292 Tu212 Tu686	[8]
	2.6. Флавоноид	кверцетин		125 140	HeLa SiHa	[51]
	2.7. Красители	хлорофиллин		10.3 ± 1.4 10.4 ± 4.3 10.2 ± 3.0 6.9 ± 1.1 20.2 ± 0.8	A549 HeLa HepG2 MCF7 HCT116	[258]
	2.8. Сесквитерпеновый лактон	сантамарин		40 μM inhibited >50%	HeLa	[314]
3. Селенорганические соединения	3.1. Селенорганические соединения	1,2-(5,5'-диметокси(бис-1,2-бензоселеназол-3(2H)-он))этан		1.64 ± 0.25	U87 MG	[93]
	3.2. Производные фениларсеноксида (дйтиарсаны)	2-(4-аминофенил)-1,3,2-дйтиарсенан		0.7 ± 0.1/48h 0.6 ± 0.1/72h	HL-60	[152]
	3.3. Производные ибупрофена	фосфоибупрофен (MDC-917)		79 ± 5.6/24h	MCF-7	[259]

1.4.1.1. Ингибирование Trx/TrxR металлокомплексами

Согласно теории жестких и мягких кислот и оснований (HSAB), тиоловые и селенольные группы («мягкое основание») в боковых цепях Cys и Sec обладают высоким сродством к металлокомплексам («мягкая кислота») и образуют различные комплексы, которые являются мощными ингибиторами Trx/TrxR [312]. Среди ингибиторов TrxR млекопитающих, о которых известно в настоящее время, наиболее сильными являются комплексы золота (I) [74] со значениями IC_{50} в наномолярном диапазоне, однако они менее эффективны по сравнению с ауранофином (таблица 1).

Среди ингибиторов металлов ауранофин (АФ), золотосодержащее соединение, классифицируется ВОЗ как противоревматическое средство. Как противоопухолевый препарат [225] ауранофин запускает апоптоз посредством активации рецепторов смерти и каспаз в клетках гепатоцеллюлярной карциномы Hep3В [100]. Митохондриальная TrxR2 представляет собой привлекательную мишень для ауранофина, который вызывает митохондриальную дисфункцию в опухолевых клетках [319]. Платиносодержащие препараты (PtD) - цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин являются другими примерами металлопроизводных как эффективных ингибиторов TrxR. Ингибирование TrxR1 млекопитающих с помощью PtD сопровождается активацией транскрипции генов, регулируемых Nrf2, включая ген *TRXR1* [46]. По сравнению с Pt, противоопухолевые соединения Au являются более эффективными ингибиторами рекомбинантного TrxR1 [209]. Например, значения IC_{50} ауранофина составляют 0,12 и 3,17 мкМ для клеток HeLa и MRC-5 соответственно [221], тогда как для цисплатина эти значения выше (11,5 и 7,9 мкМ соответственно) (таблица 2).

Ртутьсодержащие органические соединения ингибируют активность как Trx, так и TrxR *in vitro*. Результаты *in vivo* показали, что метилртуть (MeHg) ингибирует Trx и TrxR в мозге и печени морских лещей-зебр. Эти результаты

показали, что система Trx может быть мишенью для ингибирующего действия MeHg, при этом наиболее эффективно подавляется активность TrxR [31].

1.4.1.2. Ингибирование Trx/TrxR халькоген- и мышьякорганическими соединениями

Халькогенорганические соединения содержат S, Se и Te или дихалькогенидную связь (-S-S-, -Se-Se- или -Te-Te-) [203]. Диселениды и дителлуриды имеют сходные с дисульфидами химические свойства. Каталитический процесс тиоредоксиновой системы включает реакции тиол-дисульфидного и селенолтиол-селененилсульфидного обмена, действие на которые дихалькогенидов приводит к ингибированию TrxR или Trx [315]. В физиологических условиях *in vivo* диселениды (RSeSeR) могут быть восстановлены с образованием селенол/селената (RSeH/RSe-) при использовании НАДФН(H⁺) в реакции, катализируемой TrxR. Производные диселеноаминокислот могут имитировать GPx и служить субстратом для TrxR млекопитающих [255].

1.4.1.3. Ингибирование Trx/TrxR природными соединениями. Полифенолы

Полифенолы представляют собой широко распространенную группу природных биоактивных соединений растительного происхождения [2, 173], имеющие полифенольную структуру. Антиоксидантная активность полифенолов определяет их благотворное действие на здоровье человека [173]. Значительные данные эпидемиологических исследований показали, что потребление полифенолов с пищей связано с защитой от развития нескольких типов рака, а также от острых и хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, остеопороз и сахарный диабет [197, 232]. В развитии таких заболеваний участвует окислительный стресс [232]. Таким образом, играя важную роль в контроле генерации активных форм кислорода (АФК) и снижении окислительного стресса [248], полифенолы посредством модуляции редокс-зависимых сигнальных путей способствуют повышению жизнеспособности клеток [290].

Однако, несмотря на антиоксидантную активность, полифенолы могут оказывать прооксидантное действие, с которым связано их проапоптотический эффект в опухолевых клетках. Таким образом, в зависимости от концентрации и клеточного контекста полифенольные соединения могут действовать как антиоксиданты или прооксиданты [139]. Различные классы, принадлежащие к этой группе, классифицируются на основе их структуры. К полифенолам относятся фенольные кислоты, стильбены, флавоноиды, лигнаны и куркуминоиды [50]. В растениях полифенолы являются вторичными метаболитами, которые играют важную роль в защите от УФ-излучения и патогенов [197] и синтезируются двумя метаболическими путями - шикиматным и фенилпропаноидным путем [211].

1.4.1.3.1. Флавоноиды

Флавоноиды - наиболее известные полифенольные соединения [1], включающие большую группу полигидроксиароматических соединений, широко распространенных в растительном мире [134]. Известно более 8000 производных флавоноидов [105].

Шесть основных подклассов флавоноидов, включая флавоны, изофлавоны, флаваноны, флаванолы, флаван-3-олы (катехины) и антоцианы, имеют основную структуру, состоящую из двух бензольных колец (А и В), связанных через 3-х углеродное гетероциклическое кольцо (кольцо С) [227]. Структура основных классов полифенолов - флавоноидов и куркуминоидов представлена на рис. 3.

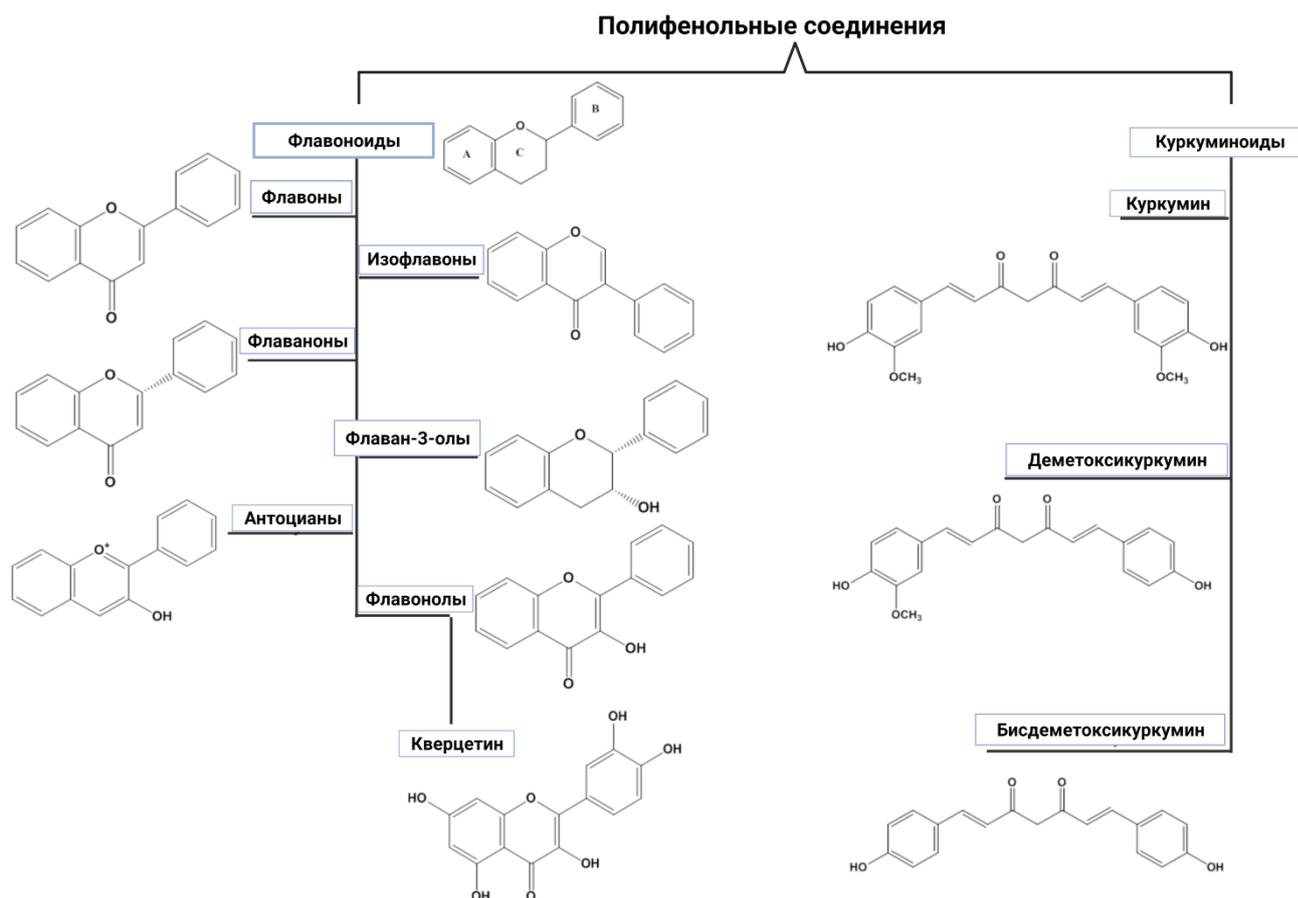


Рис. 3. Структура основных групп полифенолов - флавоноидов и куркуминоидов.

В последние десятилетия наблюдается постоянно растущий интерес к производным флавоноидов из-за их противовоспалительного, противоопухолевого действия и антиоксидантной активности [131, 271]. Среди флавоноидных соединений наиболее значимым флавонолом является кверцетин [20].

1.4.1.3.2. Кверцетин

Кверцетин (QU), один из наиболее известных флавоноидов (рис. 3), широко распространен в природе, содержится в таких фруктах и овощах, как лук, капуста, яблоки, а также в чае, орехах и ягодах [20]. Название «кверцетин» происходит от латинского слова «quercetum», что означает дубовый лес [135]. Название кверцетина по номенклатуре Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) — 3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон и также известен

как 3,3',4',5,7-пентагидрокси-2-фенилхромен-4-он [143]. Кверцетин встречается в виде агликона, лишённого присоединённого сахарного фрагмента, или в виде гликозида (со связанными сахарами, такими как глюкоза, рамноза или рутиноза). Функциональная гликозильная группа, присоединённая к скелету кверцетина, может вызывать изменения растворимости, абсорбции и эффектов *in vivo*. По сравнению с агликоном кверцетина, конъюгированная форма гликозида кверцетина всасывается более эффективно [95, 219]. *In vitro* и *in vivo* показано, что кверцетин обладает рядом биологических активных свойств, в том числе противовоспалительным и антиоксидантным действием [261]. Поскольку кверцетин не повреждает здоровые клетки и является цитотоксичным для опухолевых клеток, считается, что он может использоваться как противоопухолевое средство благодаря своей способности подавлять различные виды злокачественных новообразований (включая рак молочной железы, легких, носоглотки, почек, колоректального рака, предстательной железы, поджелудочной железы и яичников) [238]. Кроме того, кверцетин обладает противовоспалительным, прооксидантным, антипролиферативным действием, способностью подавлять ангиогенез и прогрессию метастазов путем активации апоптоза и остановки клеточного цикла, а также воздействовать на аутофагию [238, 261], что подробно обсуждается ниже.

1.4.1.3.3. Куркуминоиды

Куркуминоиды — природные активные полифенольные соединения, полученные из куркумы. Куркуминоиды обычно используются в качестве пряности, пигмента или пищевой добавки, а также обладают широкой биологической активностью, включая как антиоксидантное, нейропротекторное, противовоспалительное, противоопухолевое, антимикробное, противовирусное, антиангиогенное, антипролиферативное и антидиабетическое свойства [7].

Фармакологическая активность куркумы в основном включает действие трех куркуминоидов (рис. 3), а именно куркумина (Cur, который является

основным куркуминоидом), деметоксикуркумина (DMC) и бис-деметоксикуркумина (BDMC) [199].

1.4.1.3.4. Куркумин

Куркумин (1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион; диферулоилметан) широко используется в качестве повседневной специи для придания особого вкуса пищи и в качестве ингредиента в традиционной фитотерапии [186]. Куркумин обладает кето-енольной таутомерией с преобладанием кето-формы в нейтральных и кислых растворах и переходит в стабильную енольную форму в щелочных средах [9]. Помимо низкой биодоступности и быстрого метаболизма под действием ферментов в желудочно-кишечном тракте, гидрофобные свойства куркумина после перорального приема способствуют низкой скорости его всасывания в желудочно-кишечном тракте. Современные технологии инкапсуляции эффективно защищают куркумин от химической деградации, повышают его диспергируемость в воде и улучшают биодоступности [322].

Куркумин обладает различными фармакологическими свойствами, включая антиоксидантное, противовоспалительное, нейропротекторное, противоопухолевое, гепатопротекторное, нефропротективное и кардиопротекторное действие [242]. Особенный интерес вызывают его антиоксидантные свойства, связанные с противоопухолевыми эффектами.

1.5. Окислительно-восстановительные свойства и биологические эффекты кверцетина и куркумина

1.5.1. Антиоксидантные и прооксидантные свойства

Окислительный стресс определяется как дисбаланс между про- и антиокислительными системами, который запускает усиленные процессы окисления, приводящие к деструкции клетки [28, 133]. Антиоксидантные механизмы полифенолов включают подавление образования АФК 1) посредством ингибирования активности прооксидантных ферментов ферментов,

участвующих в их производстве; 2) путем непосредственного удаления АФК, действуя в качестве доноров водорода; 3) в результате хелатирования ионов металлов, участвующих в генерации АФК; 4) путем подавления окислительных реакций за счет повышения экспрессии генов антиоксидантных ферментов; 5) в результате синергического действия с другими соединениями, усиливая антиоксидантный статус клетки [160]. Антиоксидантная активность полифенолов обусловлена наличием в их структуре гидроксильных групп [222].

. Благодаря высокой антиоксидантной способности, обусловленной наличием фенольных групп и двойной связи в структуре, кверцетин может быть не только «скевенджером» свободных радикалов, но и поддерживать стабильный клеточный редокс статус за счет повышения экспрессии генов антиоксидантных ферментов, таких как SOD1 и каталаза, а также уровня GSH [59 Кроме того, способность куркумина улавливать свободные радикалы обусловлена либо фенольной группой OH, либо группой CH₂ фрагмента β-дикетона (гептадиендиона) [10, 249].

Расчеты молекулярного докинга указывают на стабилизирующее взаимодействие между кверцетином или его основными окисленными метаболитами и доменом белка Keap1 в сайте связывания с транскрипционным фактором Nrf2, что приводит к высвобождению Nrf2 - главного регулятора антиоксидантной защиты [273], последующей его ядерной транслокации и активации экспрессии генов с ARE (антиоксидант-респонсивным элементом) в промоторной области [214, 273]. Так, кверцетин может защищать гранулезные клетки человека от окислительного стресса, повышая как как уровень белка Nrf2, так и экспрессию его гена *NFE2L2* [214].

Использование мета-анализа позволило установить, что чистый куркумин как хелатор металлов способствует снижению уровня АФК, подавляя реакцию Фентона; способен снижать концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке в результате повышения общего антиоксидантного статуса [104]. Более того, куркумин является ингибитором циклооксигеназы и липоксигеназы,

участвующих в генерации АФК [99].

Антиоксидантное действие кверцетина и куркумина является предотвращает повреждение клеток в условиях окислительного стресса. Пероральное введение куркумина или кверцетина продемонстрировало защитные системные эффекты против окислительного стресса путем стимуляции антиоксидантной защиты (уровни церулоплазмينا и GSH) и снижения уровня MDA у взрослых самцов крыс. Анализ сыворотки крови позволил установить более высокий антиоксидантный эффект куркумина по сравнению с кверцетином, тогда как в легких введение кверцетина привело к более положительному эффекту в снижении перекисного окисления липидов [28]. Однако кверцетин и куркумин могут обладать прооксидантной активностью в зависимости от конкретного набора условий. Особое значение имеют их концентрация и редокс статус клетки [133]. Так, установлено, что использование низкой дозы микрокапсулированного кверцетина (10 мг/кг) сопровождается его антиоксидантным эффектом и протекторным действием на интерстициальные клетки Кахаля (ИСС) и макрофаги тощей кишки крыс с диабетом. Однако высокая доза кверцетина (100 мг/кг) усиливала состояние диабета, а также приводила к прооксидантному типу действия на крыс в группе с нормогликемией [274]. Прооксидантная способность кверцетина связана с его активацией апоптоза в линиях опухолевых клеток [171].

Теория функциональной плотности (метода расчёта электронной структуры) была использована для выяснения антиоксидантных и прооксидантных свойств кверцетина и его способности к комплексообразованию с ионами металлов, а также для оценки антиоксидантного и прооксидантного потенциала комплексов ионов металла с кверцетином. Прооксидантный потенциал кверцетина был оценен по восстановлению комплексов $[\text{Quer-Cu}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ до комплексов $[\text{Quer-Cu}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ с $\text{O}_2^{\bullet-}$ и аскорбат-анионом (Asc^-). В этой реакции ион $\text{Cu}(\text{II})$ восстанавливается

до Cu(I), который участвует в реакции Фентона с образованием радикалов $\cdot\text{OH}$ [263].

Куркумин необратимо ингибирует активность TrxR1 посредством алкилирования остатков Cys496 и Sec497 в активном центре фермента. Эта модификация TrxR1 куркумином приводит к потере Trx-восстанавливающей способности, которая заменяется появлением НАДФН-оксидаза-подобной активности с образованием АФК, что способствует сдвигу функциональной активности фермента с антиоксидантной на прооксидантную [68].

1.5.2. Противоопухолевые эффекты

Полифенольные соединения кверцетин и куркумин являются многообещающими соединениями, играющими значимую роль в регуляции роста злокачественных новообразований посредством управления широким спектром клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация, апоптоз, клеточный цикл и реакции на окислительный стресс. Противоракловые эффекты этих соединений связаны с их модифицирующим действием на центральные элементы различных сигнальных путей, включая MAPK, PI3K, Akt, mTOR, а также с влиянием на опухолесупрессирующий белок p53 и онкопротеины RAS [42].

Дефект сигнальных путей p53 является критическим фактором возникновения и прогрессирования опухоли [121]. Полифенолы регулируют не только экспрессию гена *p53*, но и посттрансляционные модификации белка p53, такие как метилирование, фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинирование, которые в совокупности влияют на функции p53 в ответ на повреждение ДНК, контроль апоптоза, регуляцию клеточного цикла. и старение [42].

Противоопухолевые эффекты кверцетина и куркумина описаны в ряде недавних исследований и в определенной мере могут быть объяснены механизмами, указанными в Таблице 3.

Таблица 3. Цитотоксичность действия кверцетина и куркумина на линии опухолевых клеток.

	Линия клеток	Соединение	IC ₅₀ , мкМ	Арест	Тип действия	Ссылка
				клеточно го цикла, фаза		
	MCF-7	куркумин	37	G1	индукция апоптоза: снижение уровня циклина D1, белка Twist и фосфо-p38MAPK.	[212]
молочная железа	MCF-7	куркумин	1.32	G2/M	индукция апоптоза: снижение CDC25 и CDC2, повышение уровня p21, ингибирование фосфорилирования Akt/mTOR, снижение Bcl2, повышение уровня Вах и каспазы-3	[98]
	T47D		2.07			
	MDA MB		4.69			
	415					
	MCF-7	куркумин	8.84	G1	снижение уровня циклина D1, циклина E1 и CDK2. Активация митохондриального пути апоптоза	[244]
MDA-MB-231	аналог В14		8.33			
яичники	SKOV-3	кверцетин	100	G2/M	снижение уровня циклин D1	[40]
	SKOV-3	куркумин	24.8	G2/M	подавление сигнального пути PI3K/Akt, уровня Bcl2, повышение уровня каспазы3 и Вах	[309]
толстая кишка	HT-29	кверцетин	81.65	G0/G1	снижение уровня p-Akt, CSN6, Мус и BCL-2, повышение уровня p53 и Вах	[301]
	HCT116	куркумин	20	S	дегенерация митохондрий и высвобождение цитохрома с	[239]
	HCT116+c h3		5			

ЛЕГКИЕ	A549	кверцетин	5.14	G2/M	повышение уровня Вах, снижение Bcl2.	[321]
	H446	куркумин	~10	G2/M	снижение уровня Bcl2, повышение уровня Вах и цитохром с.	[18]
МОЧЕВОВОЙ	5637	кверцетин	47.91	рост subG0/G1	повышение активности каспаз 3/7 и фрагментации ДНК	[254]
	T24		67.26			
	T24 RT4	куркумин	15 15	G2/M	снижение уровня Trp2 и циклина E1, повышение уровня p27	[316]
ГЛИОМА	U87MG	кверцетин	62.04	S	подавление образования АФК и ангиогенеза	[154]
	LN229	куркумин	5.85	G2/M	активация апоптоза и генерации АФК	[159]
	GBM8401		6.31			
	LN229	диметокси-	18.99	G2/M	снижение уровня p-mTOR, p- CDC2 и BCL-2, повышение p- АКТ, p-ERK, LC3B-II и p62.	[159]
GBM8401	куркумин	16.82				
ЛЕЙКЕМИЯ	Nalm6	кверцетин	20	S	интеркаляция ДНК, активация митохондриального пути апоптоза	[253]
	HL-60	куркумин	46.98	G1	подавление фосфорилирования АКТ, PRAS40, 4E-BP1, P70S6K, RAF-1, p27 в клетках ML-2 и OCI-AML5	[325]
	ML-2		21.51			
	MOLM-13		53.18			
	OCI-AML3		71.43			
	OCI-AML5		38.45			
	U937		59.80			

Так, в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7 кверцетин вызывает снижение уровня транскрипционного фактора Twist – одного из ключевых активаторов эпителиально-мезенхимального перехода, активации апоптоза посредством остановки G1/S, снижения уровня циклина D1 и фосфорилирования p38 MAPK [212]. Установлено, что *in vitro* куркумин эффективно подавляет рост клеток рака молочной железы MCF-7, T47D и MDA-MB-415 с IC50 в микромолярном диапазоне, вызывая остановку клеточного цикла в G2/M фазе за счет снижения CDC25 и CDC2 и повышения уровня p21,

ключевого механизма ингибирования пролиферации. Гиперэкспрессированный при раке молочной железы сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR связан с ростом клеток и пролиферацией опухоли, в то время как куркумин подавляет фосфорилирование и активацию сигнального пути Akt/mTOR, вызывает снижение уровня антиапоптотического белка Bcl2 и способствует росту уровня Вах и расщеплению белка каспазы-3 [98]. Аналог куркумина - В14 обладает более высоким эффектом подавления клеточного роста, чем куркумин. Значения IC₅₀ для клеток MCF-7 и MDA-MB-231 - 16,85 мкМ и 42,01 мкМ для куркумина и 8,84 мкМ и 8,33 мкМ для В14 соответственно. Кроме того, В14 снижает уровень циклина D1, циклина E1 и циклин-зависимой киназы 2, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1 и активации митохондриального пути апоптоза [244]. Уровень циклина D1 значительно снижался при действии кверцетина на клетки аденокарциномы яичников SKOV-3, однако такой эффект не наблюдался в устойчивых к цисплатину (CDDP) клетках SKOV3/CDDP. Снижение уровня циклина D1 может быть связано с изменением фазы G1/S при действии кверцетина. В то же время кверцетин существенно не влиял на уровень циклина B1 в обеих клеточных линиях [40]. В обработанных куркумином клетках SKOV3 уровни PI3K и фосфо-Akt снижались, тогда как уровни каспазы-3 и Вах были повышены. Куркумин также вызывал снижение уровня Bcl2 и координально ингибировал антиапоптотические эффекты [309].

Действие кверцетина на клетки колоректального рака человека HT-29 вызывало клеточное сморщивание, конденсацию хроматина и коллапс ядра. Кверцетин подавлял жизнеспособность клеток и индуцировал апоптоз посредством ингибирования сигналинга Akt-CSN6-Myc. После действия кверцетина уровни белков p-Akt-Thr308 и CSN6 (субъединицы конститутивной сигнасомы фотоморфогенеза 9 - COP9) снижались, что приводило к модуляции экспрессии нижестоящих генов CSN6; уровни белков Myc и Bcl-2 снижались, тогда как p53 и Вах были повышены [301]. Действие куркумина способствовало повышению эффективности химиотерапии колоректального

рака.

Сочетанное действие 5-фторурацила и куркумина на клеточных линиях колоректального рака HCT116 и HCT116+ch3 проводило к повышению уровня или расщепления про-апоптотических белков (каспаза-8, -9 и -3; PARP; Вах) и, напротив, к снижению уровня антиапоптотических белков (Bcl-x1) и белков, связанных с пролиферацией (циклин D1). Хотя 5-фторурацил активировал сигнальный путь NF-κB/PI-3K/Src, он подавлялся куркумином посредством ингибирования фосфорилирования/активации белка IκBα [239]. На клетках рака легких человека показано ингибирующее действие кверцетина на пролиферацию и активация апоптоза посредством повышения уровня Вах и каспазы-3. In vivo кверцетин продемонстрировал потенциальные эффекты снижения окислительного стресса за счет повышения уровней ферментов СОД и GPx, его использование позволило также улучшить восстановление повреждений легочной ткани, вызванных токсичным действием циклофосамида [321]. По сравнению с опухолевыми клетками HCT116, Hela, MB231, PC-9, A549 клеточная линия мелкоклеточного рака легких человека H446 оказалась наиболее чувствительной к действию куркумина. Куркумин эффективно способствует апоптозу, снижая уровень Bcl2 и повышая уровень Вах и цитохрома с [177]. Обнаружено, что эффективность кверцетина в подавлении пролиферации клеток рака мочевого пузыря человека 5637 и T24 зависит от дозы препарата. Активность каспазы-3/7 в клетках, обработанных кверцетином, повышала процент клеток в subG0/G1 фазе и фрагментацию ДНК, что указывает на индуцированную апоптотическую гибель клеток.

Кверцетин играет двойную роль в апоптозе и аутофагии. В обработанных кверцетином клетках 5637 и T24 количество белка-маркера аутофагии LC3-II постепенно увеличивалось одновременно с образованием аутофагосом. Ингибирование аутофагии посредством Vaf1 и хлорохина, перешедшее в режим гибели клеток, индуцировалось кверцетином до апоптоза. Кроме того, обнаружено, что снижение жизнеспособности клеток и усиление процессинга

LC3-II были снижены в обработанных кверцетином клетках, которые были предварительно обработаны N-ацетилцистеином, снижающим уровень АФК, что позволяет предположить, что индуцированная кверцетином цитотоксичность и аутофагия связаны с генерацией АФК [269].

Снижение уровня Trop2, поверхностного антигена 2 клеток трофобласта человека, при действии куркумина на клеточные линии рака клеток мочевого пузыря было связано со снижением пролиферации и подвижности клеток, снижением уровня циклина E1, однако приводило к повышению уровня p27 [316].

Новая стабильная гибридная молекула, состоящая из лозартана, селективного антагониста рецептора ангиотензина II подтипа 1 в качестве ингибитора АФК, и кверцетина в качестве антиоксиданта, способна регулировать уровни АФК посредством двойного механизма действия. Этот гибрид кверцетина и лозартана может модифицировать клеточный цикл, вызывая его остановку, вызывает индукцию цитотоксических эффектов и снижение пролиферации опухолевых клеток в первичных культурах мультиформной глиобластомы [270].

In vitro куркумин и его аналоги — бисдеметоксикуркумин, деметоксикуркумин и диметоксикуркумин — усиливали ранний апоптоз, поздний апоптоз и генерацию АФК в клетках глиомы LN229 и GBM8401. Действие куркумина и диметоксикуркумина, среди аналогов куркумина продемонстрировавшего потенциальную противоопухолевую активность, способствовало повышению генерации АФК, что активировало аутофагию и апоптоз, подавляя жизнеспособность клеток глиомы человека [159]. На трех линиях лейкозных клеток Nalm6, K562, СЕМ установлена дозозависимая цитотоксичность кверцетина, тогда как в клетках рака молочной железы T47D обнаружено, что кверцетин обладает ограниченной чувствительностью (IC₅₀ 160 мкМ). Во время регрессии опухоли кверцетин вызывал остановку клеток в S-фазе и дозозависимое увеличение количества клеток в суб-G1.

Цитотоксические механизмы действия как кверцетина, так и куркумина включают пути активации апоптоза (рис. 4). Кверцетин изменяет регуляцию p53, снижает активность антиапоптотического белка Bcl2 и активирует расщепление маркера апоптоза MCL1. Наблюдается падение потенциала митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома с и SMAC/DIABLO, что активирует внутренний путь апоптоза. SMAC/DIABLO ингибирует IAP (ингибиторы белков апоптоза), в то время как высвобождение цитохрома с из митохондрий служит ключевым этапом активации нижестоящих каспаз, приводя к активации каспазы-9, которая, в свою очередь, расщепляет и активирует каспазу-3. Каспаза-3 активирует апоптоз посредством фрагментации и деградации клеточной ДНК и активации PARP1 [253].

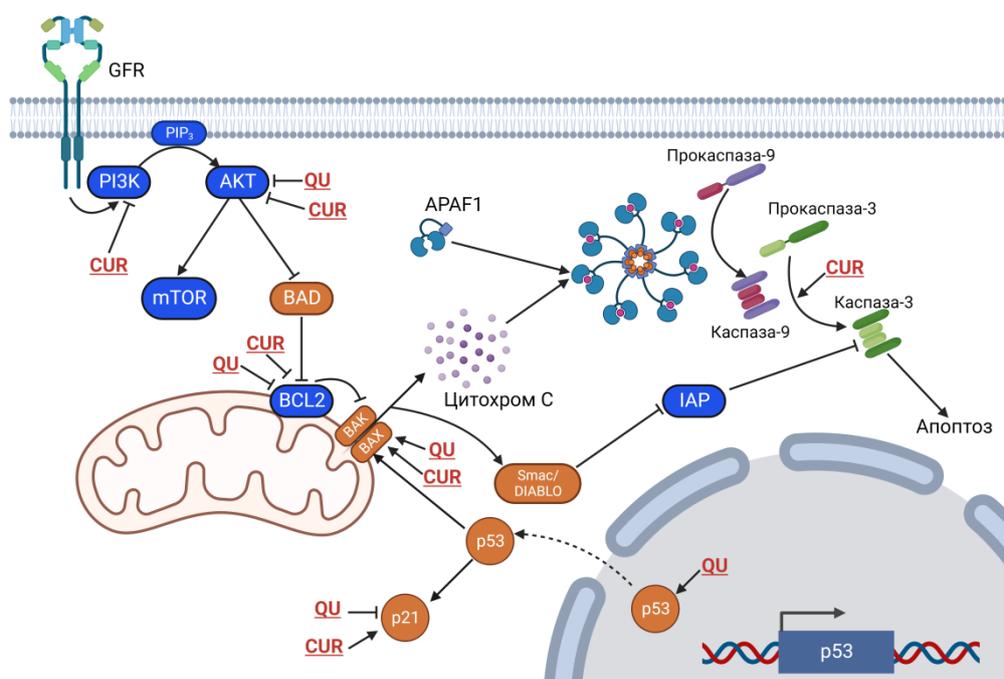


Рис. 4. Модуляция кверцетином и куркумином сигнальных путей и активация апоптоза. QU - кверцетин; CUR - куркумин.

Куркумин дозозависимым образом подавляет фосфорилирование АКТ, PRAS40, 4E-ВР1, Р70S6К, RАF-1 и р27 и регулирует уровень белков, связанных с клеточным циклом и апоптозом (циклин D1, р21, Bcl2, расщепленная каспаза-3 и расщепленный PARP), что приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу в клеточных линиях острого миелолейкоза ML-2 и OCI-AML5 [325]. Модификации нескольких клеточных сигнальных путей, включая сигнальные

пути PI3K/Akt, Wnt/ β -катенин, JAK/STAT, MAPK, p53 и NF- κ B, обобщены на рис. 4.

1.6. Комбинации с противоопухолевыми препаратами

Несмотря на различные противоопухолевые стратегии, используемые при лечении злокачественных новообразований, химиотерапия остается преобладающим терапевтическим вариантом. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) связана с развитием устойчивости опухолевых клеток к широкому спектру структурно и функционально не связанных противоопухолевых препаратов, что является одним из основных препятствий на пути успешной химиотерапии. Опухолевые клетки в большой степени проявляют устойчивость к химиотерапевтическим агентам в результате гиперэкспрессии генов мембранных белков-транспортеров семейства ABC, выкачивающих химиотерапевтические агенты из клеток. Другие механизмы МЛУ включают усиление детоксикации лекарств и репарации ДНК, подавление регуляции апоптоза и усиление сигнальных путей, связанными с процессами жизнеобеспечения клеток. Фитохимические вещества недавно были определены как агенты, обращающие МЛУ и которые также действуют как химиосенсибилизаторы в сочетании с химиотерапевтическими агентами для повышения их эффективности в отношении опухолевых клеток [83, 226]. Все больше данных доказывает, что комбинация кверцетина или куркумина с такими химиотерапевтическими агентами, как доксорубин (DOX) и цисплатин, показано ниже, значительно усиливает их противоопухолевую эффективность.

Совместное действие кверцетина и цисплатина синергически подавляет пролиферацию, миграцию и инвазию и усиливает апоптоз в клетках рака шейки матки человека HeLa и SiHa за счет снижения уровня матриксной металлопептидазы 2 (MMP2), эзрина, Р-гликопротеина и метилтрансферазы 3 (METTL3) [295]. Кроме того, совместное введение кверцетина и ДОКС может усиливать цитотоксичность DOX в отношении клеток MDA-MB-231/MDR1,

вызывая повышение внутриклеточного накопления DOX за счет подавления экспрессии Р-гликопротеина и инициации митохондриальных путей апоптоза [150].

Комбинированное действие куркумина и цисплатина улучшает химиотерапевтическое действие цисплатина на клетки плоского рака гортани человека Her2, что может быть связано с повышением роли катионного канала TRPM2 (транзиторный рецепторный потенциал меластатина 2) в притоке ионов Ca^{2+} и развитии митохондриального окислительного стресса [77].

Система совместной доставки CUR-PEI-K14/p53 для одновременной доставки куркумина и ДНК p53 значительно повышает чувствительность клеток SKOV-3/CDDP к цисплатину за счет повышения уровня мРНК p53 и Вах и снижения уровня мРНК MDR1[80]. Обнаружено, что сенсibiliзирующее влияние куркумина на устойчивые клетки рака молочной железы MCF-7/DOX и MDA-MB-231/DOX к действию DOX связано с подавлением АТФазной активности транспортера ABCB4 (семейство ABC) [289]. Этот эффект также может быть связан со снижением экспрессии гена и функции Pgp и кальций-связывающего белка A8 S100 (S100A8), что вызывает внутриклеточный дисбаланс ионов Ca^{2+} и приводит к усилению стресса эндоплазматического ретикулума и активации апоптоза в клетках K562/DOX. Установлено, что совместное действие куркумина и кверцетина вызывает подавление пролиферации в результате падения мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), высвобождения цитохрома c, снижения фосфорилирования киназ АКТ и ERK в клетках рака желудка человека MGC803 [311], а также подавление белков сигнального пути Wnt/ β -катенин, включая DVL2, β -катенин, циклин D1, Cox2 и Axin2 наряду с модуляцией апоптотических путей, включая Bcl-2, каспазу-3 /7 и расщепление PARP в клетках меланомы A375 [252].

1.7. Баланс систем Trx/TrxR и GSH/Grx в норме и при патологии

Существует значительное количество данных о большом сходстве функциональной активности между системами Trx и глутаредоксина (Grx). Так,

установлено, что система GSH/Grx выполняет резервную роль в случае снижения активности Trx1 в клетках HeLa с дефицитом TrxR1 [64]. Обе системы действуют как антиоксидантные регуляторы в ответ на окислительный/нитрозативный стресс. Повышенный клеточный уровень АФК может вызвать повреждение ДНК и способствовать развитию канцерогенеза; поэтому, клеточные антиоксиданты Trx и GSH, обратимо регулирующие тиоловые модификации, уже давно рассматриваются среди систем, регулирующих развитие злокачественных новообразований [25]. Trx и Grx также участвуют в синтезе и репарации ДНК в качестве донора электронов для восстановления окисленной формы рибонуклеотидредуктазы. Электроны, необходимые для восстановления рибонуклеотидредуктазы, доставляются от НАДФН(H⁺) через системы Trx или Grx [16, 237]. Более того, Trx и Grx обеспечивают баланс редокс-зависимых реакций, регулирующих пролиферацию и выживание [85].

1.8. Роль Trx/TrxR в опухолевых клетках

Как ферментативные, так и неферментативные молекулы антиоксидантов регулируются общим транскрипционным фактором Nrf2 [265], который транслоцируется в ядро в ответ на окислительный стресс [264] (рис. 2).

Транслокация активного фосфорилированного Nrf2 в ядро приводит к активации транскрипции многих генов белков антиоксидантной системы, включая глутатионпероксидазу 1 (*GPX1*), глутатион S-трансферазу *mu* 1 (*GSTM1*), каталитическую субъединицу γ -глутамилцистеин лигазы (*GCLC*), глутатионредуктазу (*GSR*), феррохелатазу (*FECH*), *TRX1*, *TXNRD1* и NAD(P)H хинондегидрогеназу1 (*NQO1*) [84]. Кроме того, установлено, что Nrf2 регулирует транскрипцию гена гемоксигеназы 1 (*HO1*) посредством активации ERK киназы (*ERK*) и фосфатидилинозитол-3-киназы (*PI3K*) [122]. Активация AMPK, непосредственно фосфорилирующей Nrf2 по Ser550 *in vivo* и по остатку Ser558 *in vitro*, в сочетании с AMPK-опосредованным ингибированием киназы

гликогенсинтазы 3β (GSK3 β) способствует ядерному накоплению Nrf2 с последующей активацией транскрипции ARE-контролируемых генов. Помимо своей роли в активации Nrf2, путь PI3K/Akt вызывает ингибирующее фосфорилирование GSK3 β [111]. В совокупности гены-мишени Nrf2 можно разделить на разные группы, как показано на рисунке 1.

Система Trx/TrxR играет важную роль в регуляции активности Nrf2. Ядерный Trx1/Ref-1 важен для восстановления критических остатков Cys в Nrf2: один важен для связывания ДНК, а другой участвует в ядерном экспорте [41]. Кроме того, некоторые соединения могут не только ингибировать TrxR1, но и трансформировать TrxR1 в прооксидантные белки SecTRAP с НАДФН(H⁺)-оксидазной активностью, тем самым дополнительно способствуя активации Nrf2 [11]. ДНК-связывающая активность транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1, p53 и глюкокортикоидного рецептора также регулируется восстанавливающей активностью Trx1 по незаменимым остаткам цистеина [180].

Как упоминалось выше, передача редокс сигналов необходима для контроля жизнеспособности клеток с помощью системы Trx/TrxR [172], поэтому неудивительно, что эта система участвует в развитии злокачественных новообразований [178]. Повышенная экспрессия генов системы Trx/TrxR была обнаружена во многих типах опухолей человека, таких как рак молочной железы, щитовидной железы, простаты, колоректальный рак и меланома, где она связана с опухолевым ростом [147].

Система Trx/TrxR также играет значительную роль в ходе канцерогенеза, включая стимуляцию пролиферации и роста опухоли. Опухолевые клетки, трансфицированные кДНК Trx, демонстрируют повышенный рост и снижение апоптоза, в то время как клетки, трансфицированные редокс-неактивным мутантом Trx, обладают замедленным ростом [207].

В условиях гипоксического/ишемического стресса Trx-1 эффективно способствует заживлению ран за счет улучшения ангиогенеза, а также увеличения плотности капилляров и пролиферации клеток на мышинной модели

ишемической раны [299]. Экспериментальные данные показывают, что терапия Trx-1 в ишемической ране модулирует экспрессию проангиогенных генов путем активации пути выживания PI3K/Akt с последующим β -ингибированием GSK-3 и транслокацией β -катенина в ядро. Ядерный β -катенин связывается с семейством транскрипционных факторов TCF/L (Т-клеточного фактора/фактора лимфоидного энхансера) и запускает экспрессию ангиогенных генов, таких как ген фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (*VEGF*). Впоследствии VEGF связывается со своим рецептором Flk-1 и активирует каскад p38-МАРК для миграции и выживания [224].

Аналогичные результаты были получены на ряде клеточных линий рака (карцинома молочной железы человека MCF-7, карцинома толстой кишки человека HT29 и лимфома мыши WEN17.2), трансфицированных человеческим Trx-1. Человеческий Trx-1 увеличивает уровни HIF-1- α , продукцию VEGF и ангиогенез опухоли. Напротив, трансфекция редокс-неактивным мутантом Trx-1 (Cys32,35/Ser32,35) заметно снижает HIF-1 α и VEGF в клетках MCF-7 [288].

Сообщалось о значительном совпадении между системами Trx и глутаредоксина. Также сообщалось, что система GSH/Grx играет резервную роль в снижении уровня Trx-1 в клетках HeLa с дефицитом TrxR-1 [64]. Обе системы действуют как антиоксидантные регуляторы в ответ на окислительный/нитрозирующий стресс. Повышенные клеточные уровни АФК и РНС могут повредить ДНК и способствовать канцерогенезу; следовательно, антиоксидантные клеточные восстановители Trx и GSH, которые обратимо регулируют тиоловые модификации, уже давно считаются молекулами, подавляющими рак [25]. Они также участвуют в синтезе и репарации ДНК в качестве доноров электронов для рибонуклеотидредуктазы. Электроны, необходимые для восстановления рибонуклеотидредуктазы, доставляются НАДФН через системы Trx или Grx [16, 237]. Более того, они обеспечивают уравновешивающие реакции, которые регулируют пролиферацию и выживание [85].

Наконец, Trx также способствует восстановлению окисленных пероксиредоксинов (Prxs), модулируя окислительно-восстановительный статус и выступая в качестве важного медиатора передачи редокс сигналов [216, 291]. Восстановленный Trx может переносить восстанавливающие эквиваленты в окисленную форму Prx, а восстановленный Prx, в свою очередь, удаляет H₂O₂ [198]. Митохондриальный Prx3 является субстратом как для Trx2, так и для Grx2 с одинаковой каталитической эффективностью за счет механизма реакции дитиола, тогда как митохондриальный Prx5 ограничен системой Trx [86]. Эти три антиоксидантные системы (Trx/Grx/Prx) вместе способствуют сбалансированным редокс-зависимым реакциям, которые регулируют клеточные процессы пролиферации и апоптоза.

1.9. Система TrxR/Trx при лекарственной устойчивости опухолей

Некоторые данные свидетельствуют о том, что Trx может быть необходим, но недостаточен для формирования устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам [208]. Во-первых, показано, что устойчивость клеточных линий Т-клеточного лейкоза к DOX и линий клеток рака яичников к цисплатину связана с повышенным внутриклеточным уровнем Trx1 [281, 296]. Кроме того, клетки гепатоцеллюлярной карциномы с повышенным уровнем Trx1 менее чувствительны к цисплатину (но не менее чувствительны к DOX или митомицину С) [118]. Во-вторых, в клетках рака мочевого пузыря и простаты, обладающих устойчивостью к цисплатину, уровни мРНК и белка Trx1 повышены в 4–6 раз по сравнению с клетками дикого типа, однако снижение уровня Trx1 с помощью антисмысловой плазмиды восстанавливает чувствительность к цисплатину и повышает чувствительность к некоторым другим цитотоксическим препаратам [304]. В резистентных к цисплатину клетках рака желудка и толстой кишки так же обнаружен повышенный уровень Trx1 [296]. В-третьих, стабильная трансфекция клеток фибросаркомы геном *TRX1* приводила к повышению устойчивости к цисплатину [231], однако не повышала устойчивость клеточных линий рака яичников и

толстой кишки к цисплатину, доксорубицину или митомицину [297]. Последнее предполагает, что для придания резистентности этим клеточным линиям может потребоваться дополнительный фактор к повышенному уровню Trx1. GSH важен для устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам. Глутатион-S-трансферазы (GST) катализируют конъюгацию GSH со многими электрофильными соединениями и могут активироваться различными противоопухолевыми препаратами [267]. GST обладают селен-независимой пероксидазной активностью. Изоформа Mu обладает глутаредоксиновой активностью. Некоторые агенты (например, мелфалан и кармустин (BCNU)) являются субстратами для GST и непосредственно инактивируются конъюгацией с GSH, что способствует формированию резистентности, усиливая систему детоксикации. В группе линий раковых клеток экспрессия генов изоформ GST обратимо коррелирует с чувствительностью к алкилирующим агентам. Другие препараты, повышающие уровень GST, могут также способствовать развитию резистентности, поскольку GST может также ингибировать MAP-зависимые апоптотические пути, в частности активность киназ JNK1 и ASK1, и вызывать подавление активации апоптоза.

Как упоминалось выше, активность системы Trx/TrxR имеет значение для агрессивного роста опухоли. Из доступных в настоящее время химиотерапевтических препаратов цисплатин может напрямую влиять на систему Trx/TrxR [14]. Известно, что цисплатин образует комплексы с ДНК, что приводит к нарушению репликации и транскрипции, образованию комплексов с клеточными белками и, как следствие, к цитотоксичности. Установлено, что цисплатин может необратимо ингибировать TrxR, но не влияет на Gtx-систему. Ингибирующий эффект цисплатина на TrxR, по-видимому, опосредован ковалентной модификацией восстановленного сайта селеноцистеина. В цисплатин-резистентных клетках Jurkat T, обладающих повышенной экспрессией генов и активностей TrxR и Trx, чувствительность к цисплатину восстанавливалась путем действия высоких концентраций селената натрия -

ингибитора Trx [231]. Известно так же, что избыток оксида селена *in vitro* может вызывать окисление Trx, подавление роста опухолевых клеток и способствует развитию апоптоза [27, 286].

1.10. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR

1.10.1. Роль в регуляции клеточных процессов. Связь с внутриклеточным уровнем АФК

Комплекс PI3K/AKT/mTOR представляет собой сигнальный путь, играющий важную роль в таких процессах жизнедеятельности как клеточный метаболизм, рост и пролиферация клеток, апоптоз и ангиогенез [145].

Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR активируется широким спектром внеклеточных стимулов, включая рецепторные тирозинкиназы, различные интегрины, рецепторы В- и Т-клеток и рецепторы, связанные с G-белком (GPCR). Членами семейства PI3K являются гетеродимеры сериновой (Ser)/треониновой (Thr) киназ, которые можно разделить на три разных класса в зависимости от их структурных характеристик и субстратной специфичности [72]. Ферменты класса I подразделяются на ферменты класса IA и класса IB, оба из которых активируются рецепторами клеточной поверхности. Ферменты класса IA могут активироваться рецепторными тирозинкиназами (RTK), GPCR и различными онкогенами, такими как небольшой G-белок Ras, тогда как ферменты класса IB активируются исключительно GPCR. Фермент PI3K класса IA включают каталитическую (p110) и регуляторную субъединицы (p85 или p101) [94, 257].

В ответ на внеклеточные стимулы белки-каркасы рекрутирования, такие как адапторный белок GAB2 (связывающий белок 2, связанный с рецептором фактора роста 2, GRB2) – основной активатор PI3K или субстраты инсулинового рецептора (IRS) 1/2, связываются с регуляторной субъединицей p85 PI3K. Происходит активация каталитических субъединиц PI3K, и фосфорилирование фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) приводит к образованию вторичного мессенджера фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3) [205].

Это облегчает рекрутирование белков, которые содержат домен гомологии плекстрина (домен PH), включая Ser/Thr-киназу Akt (также известную как протеинкиназа B) и ее вышестоящий активатор - 3-фосфоинозитид-зависимую киназу 1 (PDK1).

Киназа Akt может функционировать как протоонкоген, и в клетках млекопитающих существуют три структурно активные формы Akt - Akt1, Akt2, Akt3 или PKB α , β , γ соответственно [22]. Все три изоформы содержат N-концевой домен PH, область Т-петли каталитического домена, содержащую сайт фосфорилирования Thr308, и С-концевой регуляторный хвост с сайтом фосфорилирования Ser473 [22, 166]. Akt является цитозольным ферментом в нестимулированных клетках, тогда как её активация, опосредованная PI3K, требует транслокации Akt на мембрану, где фосфатидилинозитол (3,4,5) - трисфосфат (PIP3) служит якорем [36]. На плазматической мембране PDK1 фосфорилирует Akt по Thr308, что приводит к её частичной активации. Последующее фосфорилирование Ser473 необходимо для полной активации Akt. Это фосфорилирование достигается с помощью комплекса mTOR 2 (mTORC2), а также членов семейства PI3K-родственных киназ (PIKK) [22, 166]. Аналогичным образом происходит фосфорилирование гомологичных остатков в Akt2 и Akt3. Эта активация приводит к перемещению Akt в цитозоль или ядро, где Akt, как предполагается, может фосфорилировать более 9000 субстратов [234], участвуя тем самым в регуляции клеточного метаболизма, пролиферации, транскрипции и выживания. Комплекс mTOR1 (mTORC1) является наиболее важной нижестоящей мишенью Akt.

Активность mTOR осуществляется двумя отдельными мультибелковыми комплексами: mTORC1 и mTORC2. Эти два комплекса различаются белковыми компонентами, субстратной специфичностью и регуляцией, а также имеют разную реакцию на рапамицин и его производные (рапалоги) [204]. Комплексы mTOR имеют разные вышестоящие механизмы активации, а также разные нижестоящие субстраты. Основными мишенями mTORC1 являются

рибосомальная протеинкиназа S6 (S6K) и белок 1, связывающий эукариотический фактор инициации трансляции-4E (eIF4E) (4EBP1), тогда как наиболее распространенными субстратами mTORC2 являются Akt и родственные киназы [217].

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR аномально активируется при многих видах злокачественных новообразований, вызывая нарушение регуляции апоптоза и устойчивость к химиотерапии [149], что является результатом нарушения регуляции отдельных компонентов сигнального пути на уровнях ДНК (включая амплификацию, делецию, мутацию и слияние генов), РНК (транскрипционная и посттранскрипционная регуляция) и белка (включая контроль стабильности белка и посттрансляционные модификации). Идентификация частоты генетических изменений и мутаций «горячих точек» у больных раком посредством тщательной генетической проверки роли таких изменений с большей вероятностью предоставит доказательства их функциональной значимости, раскроет их потенциал в качестве мишени для лекарственных средств и, позволит предоставлять своевременные предложения по индивидуальной терапии [306].

Как показано выше, снижение эффективной нейтрализации избыточного уровня АФК может привести к различным серьезным патологиям, включая злокачественные новообразования. Аберрантная генерация АФК приводит к росту и прогрессированию рака через различные сигнальные пути (PI3/Akt/mTOR, PTEN, MAPK, VEGF/VEGFR и MMP). Высокие уровни АФК приводят к метастазированию посредством стимуляции сигнального пути PI3K/Akt/mTOR и передачи сигналов по MAPK путям, которые активируют нижестоящие ферменты SNAIL, MMP2 (металлопротеиназа 2) и MMP9 (металлопротеиназа 9), инициирующие эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), приводящий к метастазированию. Зависимый от гипоксии путь связан с повышением экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) через активацию PI3K/Akt/mTOR, PTEN (гомолог фосфатазы и тензина), сигнальных

каскадов MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), транскрипционного фактора HIF-1 α (индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа) и киназы p70S6K1 (рибосомальная протеинкиназа S6 B1), что приводит к высвобождению различных цитокинов, факторов роста и повышает регуляцию MMP (матриксных металлопротеиназ), активируя ангиогенез [5].

Транскрипционный фактор HIF-1 α регулируется сигнальным путем PI3K/AKT/mTOR. AKT/mTOR индуцирует нижестоящую передачу сигналов, такую как 4EBP1, которая необходима для ингибирования кэп-зависимой трансляции мРНК и увеличения трансляции HIF-1 α . Помимо воздействия на активность HIF-1 α , AKT индуцирует ангиогенез, способствуя подвижности клеток и инвазии при немелкоклеточном раке легких [170]. Гиперактивация AKT изменяет распределение эндотелиальной синтазы оксида азота 3 (eNOS), что приводит к накоплению NO и ремоделированию и формированию кровеносных сосудов [116]. Кроме того, показано, что подавление передачи сигналов AKT/mTOR/p70S6K ослабляет пролиферацию эндотелиальных клеток, что имеет решающее значение для контроля микроокружения опухоли и ангиогенеза [162, 230].

1.10.2. Лекарственная устойчивость опухоли за счет гиперактивированной онкогенной передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR

Один из наиболее часто изменяемых сигнальных путей при злокачественной трансформации и наиболее значимый из ключевых сигнальных путей, контролирующих пролиферацию и выживание большинства опухолевых клеток, сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR в последние десятилетия привлекает большое внимание как перспективная мишень для действия противоопухолевых препаратов.

Как упоминалось выше, гиперактивация передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR, наблюдаемая при раке, способствует развитию лекарственной устойчивости опухоли к противоопухолевой терапии. Так, при раке предстательной железы развивается устойчивость к паклитакселу в

основном благодаря гиперактивации путей PI3K/Akt и MAPK [155]. Активация сигнального пути PI3K/Akt приводит к резистентности в эндокринной терапии и терапии анти-HER2 при раке молочной железы [79], вызывает развитие устойчивости к 5-ФУ при колоректальном раке [142] и приводит к резистентности к паклитакселу при раке желудка [45]. Кроме того, при раке молочной железы подавление PTEN, опосредованное микроРНК132 и микроРНК212, вызывает устойчивость к адриамицину [293] и ингибиторам PI3K α [112]. С другой стороны, подавление пути PI3K/mTOR/Akt может способствовать частичному преодолению лекарственной устойчивости. Например, матрин повышает чувствительность опухолевых клеток при раке молочной железы с множественной лекарственной устойчивостью за счет снижения фосфорилирования и активности Akt [323].

В настоящее время установлен ряд механизмов, ответственных за лекарственную устойчивость опухолевых клеток, формированию которой способствует гиперактивация сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.

Первый механизм во многом обусловлен функцией пути PI3K/Akt/mTOR, направленный на подавление апоптоза и поддержание выживания клеток. Химио- и лучевая терапия, низкомолекулярные ингибиторы или другие цитотоксические препараты активируют апоптоз опухолевых клеток, вызывая их гибель. Повышенная активность PI3K/Akt/mTOR в опухолевых клетках, усиливающая фосфорилирование спектра белков-субстратов, таких как FOXO [33] и p21 [324], способствует выживанию клеток и путем фосфорилирования про-апоптотических белков Bax [298], Bad [58] и GSK3 [69] препятствует активации апоптоза. Недавно обнаружено, что апоптотические опухолевые клетки могут передавать сигнал соседним клеткам опухоли, направленный на противодействие уничтожению клеток с помощью сигнального пути PtdSer/MERTK/Akt, усиливающего цитозольную активацию Akt [108].

Второй механизм включает в себя кросс-токинг (cross-talking) между сигнальным путем PI3K/Akt/mTOR и гормональными рецепторами, что способствует эндокринной терапии рака. Так, Akt фосфорилирует рецептор эстрогена человека ER α по Ser167 и активирует ER α в отсутствие эстрогена [38] при раке молочной железы, что облегчает цитозольный ER-сигналинг [184] и восстанавливает чувствительность клеток к эндокринной терапии. С другой стороны, при раке предстательной железы гиперактивация Akt, вызванная генетическими изменениями пути PI3K/Akt, такими как мутации PIK3CA, дефицит PTEN или ингибирование AR [39], приводит к усилению фосфорилирования и инактивации AR (рецептор андрогенов), что способствует появлению устойчивости к АДТ (андрогенной депривационной терапии) и развитию кастрационно-резистентного рака предстательной железы [39].

Третий механизм включает индуцированную PI3K/Akt/mTOR модуляцию активности рецепторной тирозинкиназы (RTK) при раке. Мутации EGFR часто наблюдаются при раке легких, особенно при немелкоклеточном раке легких и раке легких, несущем мутации EGFR, при которых применяются ингибиторы EGFR, включая эрлотиниб. Сообщается, что потеря PTEN является причиной устойчивости к эрлотинибу при немелкоклеточном раке легких, что предположительно связано с повышенной активностью PI3K/Akt/mTOR [251]. Это было подтверждено недавним исследованием, показавшим, что активация Akt служит общим механизмом, способствующим устойчивости к ингибиторам ERFG при раке легких [101]. Механически клетки рака легких, несущие мутанты EGFR, устойчивые к эрлотинибу, демонстрируют реактивацию EGFR, индуцированную повышенной активностью Akt [251]. Кроме того, другим возможным механизмом является Akt-опосредованное фосфорилирование PIKfyve, которое облегчает транспортировку и деградацию EGFR [67], что впоследствии снижает уровни EGFR, что приводит к ослаблению чувствительности к ингибированию EGFR.

Четвертый механизм включает перекрестные помехи в пути PI3K/Akt/mTOR. Было замечено, что хроническое ингибирование mTORC1 рапалогам реактивирует вышестоящую передачу сигналов PI3K/Akt путем высвобождения множества петель отрицательной обратной связи через несколько сигнальных узлов, включая S6K-опосредованное фосфорилирование IRS-1 при стабилизации IRS-1 для усиления передачи сигналов PI3K/Akt [88], mTORC1-опосредованное фосфорилирование Grb10, которое отрицательно регулирует передачу сигналов инсулина [96, 308] и другие.

Пятый механизм включает роль передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR в регуляции метаболизма лекарств, оттока лекарств и экспрессии белков, устойчивых к лекарствам. Одна из основных причин множественной лекарственной устойчивости рака во многом связана с тем, что рак сверхэкспрессирует транспортеры суперсемейства ABC для выведения лекарств или других агентов для снижения токсичности [91]. Существует 48 членов ABC, принадлежащих к 7 семействам, среди которых P-gp, MRP1 и BCRP являются тремя основными переносчиками ABC, тесно связанными с множественной лекарственной устойчивостью. Активация пути PI3K/Akt/mTOR приводит к усилению экспрессии P-gp [256], MRP1 и BCRP [146] как основного общего механизма снижения концентрации лекарственного средства в клетках, что способствует устойчивости к лекарству. Ингибирование передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR с помощью ингибиторов, нацеленных на PI3K или Akt, в значительной степени преодолевает множественную лекарственную устойчивость, наблюдаемую в этих сценариях [3, 146], что указывает на важную роль передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR. при множественной лекарственной устойчивости за счет облегчения экспрессии транспортера ABC.

Шестой, но не последний механизм включает функцию передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR в модуляции иммунного микроокружения опухоли.

За последнее десятилетие иммунотерапия рака, направленная на иммунные контрольные точки, стала новым и эффективным подходом к лечению рака [279]. В качестве ингибитора PD1/PD-L1 атезолизумаб был одобрен FDA в качестве терапии первой линии для лечения пациентов с метастатическим ТНРМЖ (трижды негативным раком молочной железы) с высоким уровнем PD-L1. Передача сигналов PI3K/Akt/mTOR поддерживает выживаемость и функцию иммуносупрессивных Treg, устраняет эффективные для уничтожения опухолей популяции CD8 + Т-клеток [200], блокирует внутриопухолевую инфильтрацию CD8 + Т-клеток [4], снижают дифференцировку и функцию Т-клеток памяти [137] и увеличивают экспрессию PD-L1 в клетках рака легких [136]. Было замечено, что ингибирование передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR создает благоприятную для иммунитета среду при раке молочной железы [168] и демонстрирует синергизм с блокадой антииммунных контрольных точек в уменьшении объемов опухоли в ксенотрансплантатах [196] или *in vivo* [129] на моделях рака молочной железы. Эти данные свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR в сочетании с иммуномодулирующей терапией при лечении рака. В совокупности накапливающиеся данные подтверждают, что подавление передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR является подходом к снижению множественной лекарственной устойчивости.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

Кверцетин (QU, 3,3',4',5,7-пентагидроксифлавоон, чистота 97%) и куркумин (CUR, чистота 98%) приобретены у фирмы Acros Organics, Бельгия, цисплатин [CDDP, цис-диамминдихлорплатина (II)] - у фирмы Teva Pharmaceutical Industries Ltd. CUR хранили при -20°C в виде 10 мМ исходного раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО, Sigma-Aldrich), защищая от света.

Первичные антитела против каталазы, mTOR, фосфо-mTOR (S2448), Trx1, TrxR-1 приобретены у Abcam, Великобритания. Первичные антитела против Trx-2; СТАТ3; фосфо-СТАТ3 (Tyr705 и ser727) – у фирмы Sigma-Aldrich, США.

Первичные антитела против каспаз 3, 7 и 9, PARP; расщепленные каспазы 3 (Asp175), 9 (Asp330) и 7; расщепленный PARP (Asp214), Histone-3/GAPDH (в качестве эталонных белков) и вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена, приобретены у Cell Signaling Technology Inc., США.

2.2. Культура клеток. Условия культивирования

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. Клетки культивировали в виде монослоя в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (HealthCare, США), 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

2.3. Оценка цитотоксичности (МТТ тест)

Ингибирующее действие прединкубации с QU или Cur с последующим действием CDDP на клетки аденокарциномы яичника человека было оценено с помощью МТТ теста. За 24 часа до внесения QU или Cur (Acros Organics) клетки высевали в лунки 96-луночного планшета (Nunc) (5000 клеток в 190 мкл

культуральной среды DMEM), инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Действие куркумина (1-50 мкМ) и кверцетина (50-300 μМ) оценивали в зависимости от времени инкубации - 3, 6, 24, 48 ч, цисплатина (0,1-100 мкМ) - через 72 ч (37°C, 5% CO₂). Влияние предварительной инкубации клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP (3 и 24 ч) с куркумином (6 и 17 μМ) и кверцетином (15 и 100 μМ) на цитотоксическое действие цисплатина (17 мкМ, 72 ч) оценивали при 37°C, 5% CO₂.

Ингибирующий эффект преинкубации с QU с последующим применением CDDP на клетки рака яичников был исследован более детально. Клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 клеток на лунку в течение ночи в трех повторностях. 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 часов.

По окончании инкубации в лунки вносили 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, "ПанЭко") и продолжали инкубацию 4 ч. Затем культуральную среду отбирали, клетки ресуспензировали в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Scientific) при 570 нм. Долю выживших клеток рассчитывали как частное от деления средней оптической плотности после инкубации с данной дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (значения последних приняты за 100%). Действие каждой концентрации QU и Cur оценивали в 4 повторах.

2.4. Оценка клеточного цикла.

Исследование клеточного цикла проводили, как описано ранее [276]. Клетки рассеивали в 35 мм чашки Петри (1.5×10^5 в 3 мл культуральной среды). Оценка клеточного цикла проведена в двух группах. В первой группе исследовано влияние куркумина (6 и 17 мкМ) и кверцетина (15 и 100 мкМ) (контроль - 0,1% ДМСО) в течение 24 ч (37°C, 5% CO₂). Во второй группе

оценивали влияние предварительной инкубации с куркумином (6 и 17 мкМ в течение 24 ч) или кверцетином (15 и 100 мкМ в течение 24 ч или 60 мкМ в течение 48 ч) на цитотоксическое действие цисплатина (5 мкМ or 17 мкМ, 24, 48 and 72 ч; для SKOV-3 and SKOV-3/CDDP, соответственно при 37°C, 5% CO₂). 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. Для каждого образца накапливали не менее 10 000 флюоресцентных "событий".

2.5. Оценка внутриклеточных активных форм кислорода (АФК)

Внутриклеточный уровень АФК определяли для оценки анти- или прооксидантного эффекта при действии только QU и CUR или в случае прединкубации с QU с последующим действием CDDP на клетки сублинии SKOV-3/CDDP. Для оценки генерации АФК использован краситель CellROX Deep Red (RDR; набор для определения АФК в клетках; Abcam, Кембридж, Великобритания), который свободно проникает в клетки, где окисляется АФК до высоко флуоресцирующего состояния. Клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP высевали с плотностью $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку в 6-луночный планшет и инкубировали либо только с CDDP (4 или 24 ч), либо отдельно только с QU или CUR (24 или 48 ч), либо с последующим введением CDDP (4 или 24 ч), используя 5 мМ H₂O₂ в качестве положительного контроля («Экотекс», Россия; эталонный индуктор АФК) в течение 30 мин отдельно.

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). Данные анализировали с помощью программы FACSDiva (BD Biosciences). Генерация АФК для каждого соединения представлена в процентах на основе сдвига флуоресценции RDR в обработанных и необработанных

клетках. На каждый образец зарегистрировано десять тысяч флуоресцентных «событий».

2.6. ПЦР в режиме реального времени (Real-time RT-PCR).

Экспрессию генов оценивали с использованием обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени (Real-time RT-PCR). Суммарную РНК из клеток экстрагировали с использованием набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) в соответствии с протоколом производителя. Тотальную РНК (5 мкг) подвергали обратной транскрипции с помощью набора MMLV RT ("Евроген") в 25 мкл реакционной смеси с последующей ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием DTprime5 (DNA Technology). Реакционную смесь готовили с использованием qPCRmix-HS SYBR ("Евроген"). Применяли двухтемпературный режим реакции (отжиг праймеров/элонгация). Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Анализ кривой плавления проводили в конце реакции (после 45-го цикла) при температуре от 60 до 95°C для оценки качества конечных продуктов ПЦР. Стандартные кривые эффективности реакции построены с использованием серийно разведённых образцов (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320). Уровни мРНК исследуемых генов нормализовали относительно экспрессии референсного гена *GAPDH*. Расчёт относительной концентрации РНК выполнен с использованием программного обеспечения DTprime5. Используемые в работе праймеры представлены в таблице 3.

Таблица 4. Праймеры, использованные для ПЦР в режиме реального времени.

Ген	Праймер
<i>TRX1</i>	F: 5'-TGGTGAAGCAGATCGAGAGCAAGA-3'
	R: 5'-ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA-3'
<i>TRX2</i>	F: 5'-TGGTGGCCTGACTGTAACAC-3'
	R: 5'-TGTTGACCACTCGGTCTTGA-3'

<i>TXNRD1</i>	F: 5'-GTGTTGTGGGCTTTCACGTA-3' R: 5'-TGGTCAGTCCACATTTGAGC-3'
<i>TXNRD2</i>	F: 5'-GCCATAGCACCTTGCATCTC-3' R: 5'-ATCCTCGATGAGGACACCTG-3'
<i>PRDX1</i>	F: 5'- ACAGCCGTTGTCAATGGAGAG -3', R: 5'- ACGTCGTGAAATTCGTTAGCTT -3'
<i>PRDX2</i>	F: 5'- CTGGCGAAGGACACCCTTGCCATC-3', R: 5'- GGCCACAGCGGTGGTTGATGGCG-3'
<i>PRDX3</i>	F: 5'- CTTGGTGTATTTATCCAGGCAAGATGGC -3', R: 5'- GGCCTGCTGCATGTGGAAGAACGA -3'
<i>PRDX6</i>	F: 5'-CAACTTTGAGGCCAATACCA-3', R: 5'-CAACTTAACATTCCTCTTGG-3'
<i>PI3K</i>	F: 5'-GATTCTCAGCAGCCAGCTCTGAT-3' R: 5'-GCAGGCTGTCGTTTCATTCCAT-3'
<i>AKT</i>	F: 5'-GACAACCGCCATCCAGAC-3' R: 5'- TCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'
<i>mTOR</i>	F: 5'- ACTCGCTTCTATGACCAACTGA-3' R: 5'-TTTCCATGACAACCTGGGTCATTG-3'
<i>CAT</i>	F: 5'-GCAGATACCTGTGAACTGTC-3' R: 5'-GTAGAATGCCCGCACCTGAG-3'
<i>HO-1</i>	F: 5'-ATGGCCTCCCTGTACCACATC-3' R: 5'-GCGAAGACTGGGCTCTCCT-3'
<i>SOD1</i>	F: 5'-TGGGCAAAGGTGGAAATGAA-3' R: 5'-GCGATCCCAATTACACCACAA-3'
<i>SOD2</i>	F: 5'-AGCTATTTGGAATGTAATCAACTGG-3' R: 5'-TAAGCAACATCAAGAAATGCTACA-3'
<i>GPX1</i>	F: 5'-GGCTCCCTGCGGGGCAAGGT-3' R: 5'-AAGCGGCGGCTGTACCTGCG-3'

<i>NFE2L2</i>	F: 5'-CCAGCTATGGAGACACACTAC-3' R: 5'-TGTGAGATGAGCCTCCAAGCG-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

2.7. Вестерн-блоттинг анализ

Белки из обработанных клеток экстрагировали с использованием лизирующего буфера RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,1% додецилсульфата натрия, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА), содержащего смесь белковых ингибиторов и 2 mM фенилметилсульфонилфторида. затем выдерживали на льду в течение 30 минут и центрифугировали при 10 000×g в течение 15 минут. Общий белок в лизатах определяли количественно методом Брэдфорда. Белки разделяли с помощью 10–15% SDS-PAGE (40 мг белка на трек) и переносили на нитроцеллюлозную мембраны толщиной 0,2 мм (GE Healthcare Bio-Sci., Чикаго, Иллинойс, США). Мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком в 1x TBST (трис-солевой буфер с 0,1% Твин-20) в течение 2 часов, а затем инкубировали в течение ночи при 4 °C первичными кроличьими антителами к каталазе, mTOR, фосфо-mTOR (S²⁴⁴⁸), Trx1, TrxR-1 (Abcam, Кембридж, Массачусетс, США); Trx-2, STAT3, фосфо-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷) (Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США); каспазе 3; каспазе 7; каспазе 9, PARP, расщепленной каспазе 3 (Asp175), расщепленной каспазе 7, расщепленной каспазе 9 (Asp330), расщепленному PARP (Asp214) и Histon-3/GAPDH (в качестве референсных белков) (Cell Signaling Technology, Данверс, Массачусетс, США).

Затем мембраны дважды промывали TBST и инкубировали со вторичными антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Cell Signaling Tech., Дэнверс, Массачусетс, США) в течение 1 часа при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы визуализировали с

помощью хемилюминесценции с использованием системы Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США).

2.8. Оценка апоптотической гибели клеток

Апоптоз в опухолевых клетках (аннексин V) оценивали с использованием набора для обнаружения апоптоза аннексина V Thermo fisher kit в соответствии с протоколом производителя (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The SKOV-3 and SKOV-3/CDDP cells in the logarithmic growth phase were seeded at a density of 1.5×10^5 cells/well in a 6-well plate, incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂, and treated with CDDP alone or QU or CUR alone and followed by cisplatin в трех повторностях. После сбора клеток клетки промывали один раз в 1X PBS, затем один раз в 1X буфере для связывания. Затем клетки ресуспендировали в 1X буфере для связывания при концентрации $1-5 \times 10^6$ клеток/мл. К 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуорохромом, и инкубировали 10-15 минут при комнатной температуре в темноте. После добавления 2 мл 1X буфера для связывания образцы центрифугировали при 400-600 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Супернатанты удаляли, клетки ресуспендировали в 200 мкл 1X буфера для связывания, затем добавляли 5 мкл окрашивающего раствора йодистого пропидия и инкубировали 5-15 минут на льду и анализировали методом проточной цитометрии на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) в канале APC (фильтр 660/20 для обнаружения аннексин V-положительных клеток) и в канале PerCP-CyTM5.5 (фильтр 695/40 для PI-положительных клеток). Данные анализировали с помощью программы FACSDiva (BD Biosci.).

2.9. Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 10. 0 (StatSoft, Inc.). Данные серии аналогичных экспериментов (не менее трёх) представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего

($M \pm SEM$). Статистическую значимость различий средних оценивали с использованием t -критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Для статистического анализа и графического отображения использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Оценка редокс-системы при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину

3.1.1. Оценка Trx/TrxR системы (изоформ Trx, TrxR, Prx) в резистентных SKOV-3/CDDP клетках

Противоопухолевые препараты на основе платины, такие как цисплатин, являются химиотерапевтическими средствами при лечении ряда солидных опухолей, однако резистентность к химиотерапевтическому препарату цисплатину является основным препятствием для радикальной терапии рака [161]. Значение IC_{50} CDDP установлено для клеточной линии аденокарциномы яичника человека SKOV3 и сублинии SKVO3/CDDP, устойчивой к CDDP, используемых в качестве клеточных моделей.

С помощью МТТ теста 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. 5).

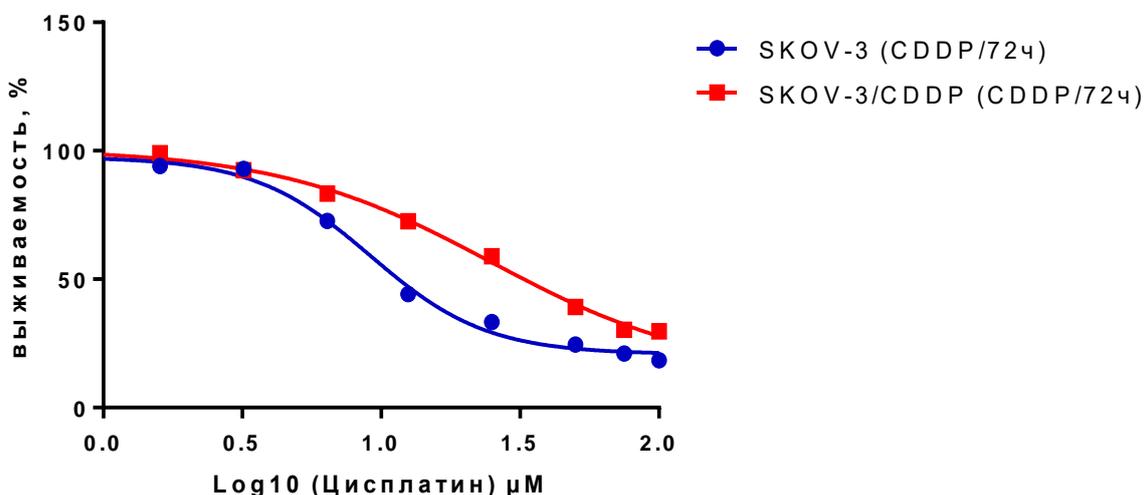


Рис. 5. Цитотоксичность CDDP *in vitro*. МТТ-анализ клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP после 72 ч действия цисплатина.

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, играющих существенную роль в клеточной антиоксидантной защите и контроле клеточного редокс-статуса – *TRX1*, *TRX2*, *TXNRD1*, *TXNRD2*.

В резистентных клетках SKOV-3/CDDP установлен значительный рост экспрессии генов Trx/TrxR системы: *TRX1*, *TRX2* - в 4,8 и 25 раз, *TRXR1*, *TRXR2* – в 23 и 89 раз соответственно (рис. 6).

Высокий рост экспрессии установлен и для генов изоформ пероксиредоксина (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX6*), катализирующих разложение H₂O₂ и образующаяся в результате окисленная форма которых восстанавливается изоформами Trx1 и Trx2 (рис. 7). Максимальный рост экспрессии обнаружен у гена *PRDX2* (в 70 раз).

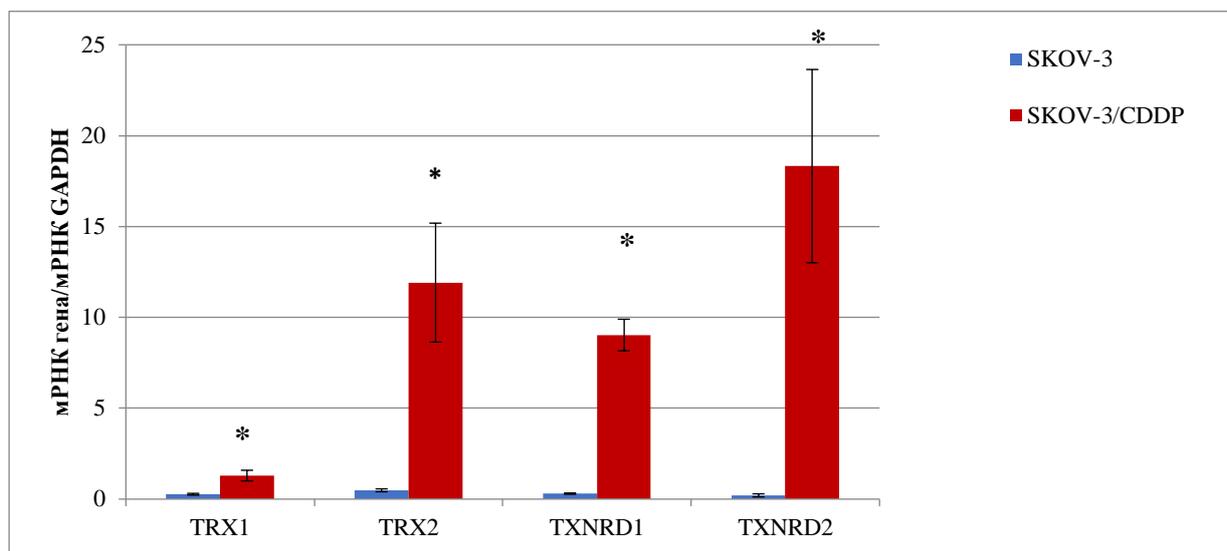


Рис. 6. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (*TRX1*, *TRX2*) и TrxR (*TRXR1*, *TRXR2*) в чувствительных (SKOV-3) и резистентных к цисплатину (SKOV-3/CDDP).

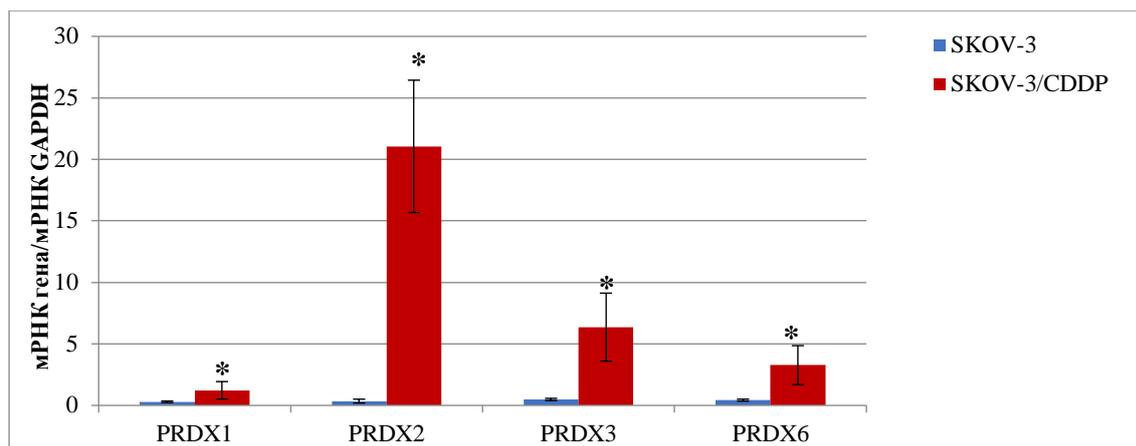


Рис. 7. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

3.1.2. 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*, *CPX1*, *HO1*, *CAT*) и транскрипционного фактора Nrf2 (*NFE2L2*), контролирующего экспрессию указанных ферментов (рис.8).

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 активации как систем генерации АФК, так и процессов антиоксидантной защиты, обеспечивая поддержание уровня АФК, которое может оказывать проонкогенное действие.

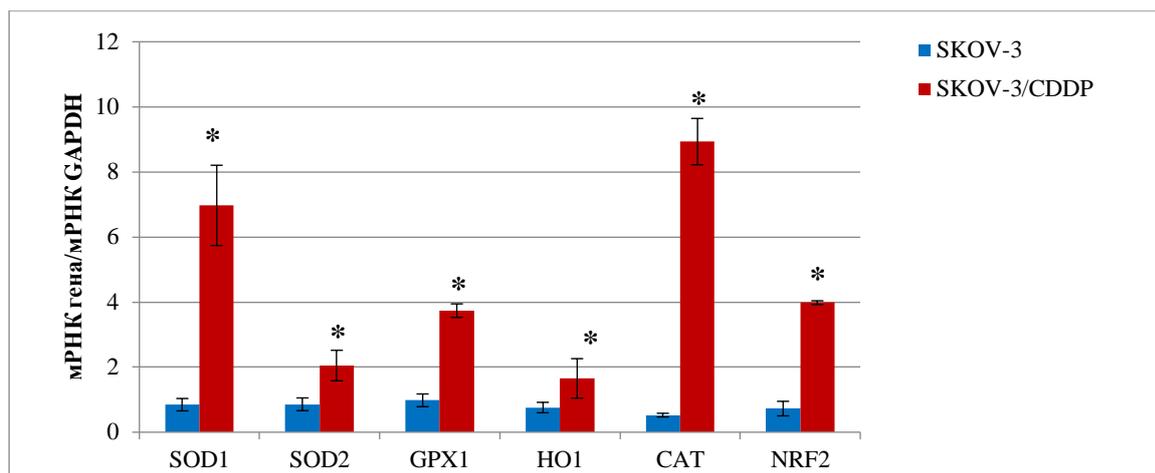


Рис. 8. Real-time RT-PCR анализ мРНК ключевых антиоксидантных ферментов (SOD1, SOD2, GPX1, HO1, CAT) и транскрипционного фактора Nrf2 в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

Оценка экспрессии генов *PI3K*, *AKT*, *MTOR* позволила установить значительный рост их экспрессии (рис. 9) в резистентных клетках (*PI3K* – в 20, *AKT* – в 18, *MTOR* – в 12 раз).

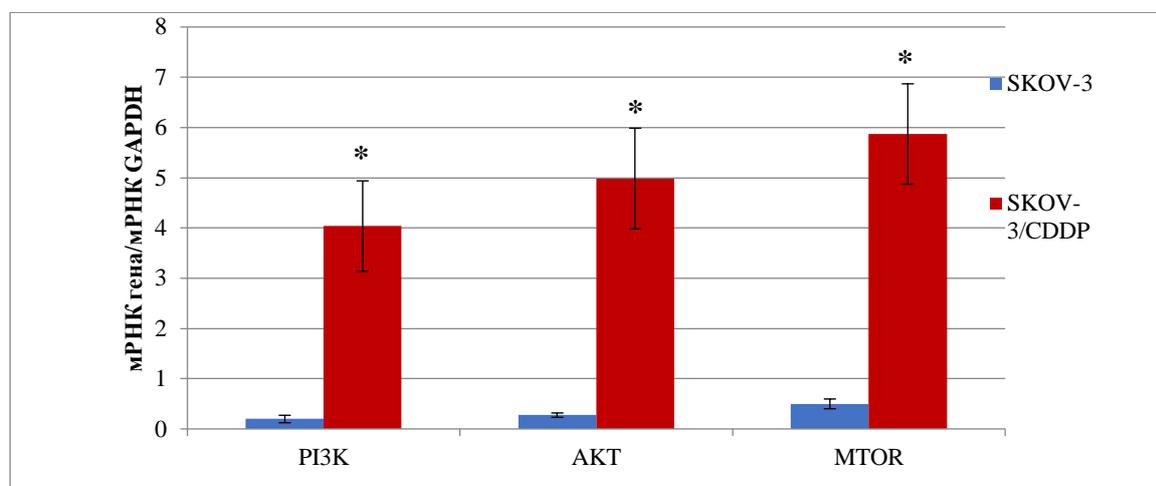


Рис. 9. Real-time RT-PCR анализ мРНК *PI3K*, *AkT*, *mTOR* в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках.

Таким образом, развитие резистентности к цисплатину в опухолевых клетках сопровождается значительным ростом экспрессии генов Tgх-зависимой системы и сопряженным с ней генов семейства Pгх, а также ключевых антиоксидантных ферментов, что усиливает антиоксидантный статус и редокс-контроль клеточных процессов (редокстаз). Данный процесс усиливается

повышенной экспрессией киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, активность которого важна в регуляции пролиферации, выживаемости и метаболизма опухолевых клеток.

3.2. Оценка влияния кверцетина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину

3.2.1. Влияние кверцетина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

Большее внимание в терапии злокачественных новообразований привлекает использование растительных полифенолов.

Влияние растительного флавоноида кверцетина (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) на опухолевые клетки имеет двойственный характер. Благодаря наличию ОН групп в В- и С-кольцах флавонового ядра, образующих два антиоксидантных фармакофора (рис.10 а), кверцетин выполняет роль «ловушки» свободных радикалов; повышенное количество ОН групп в ароматическом В- кольце делает кверцетин более сильным антиоксидантом по сравнению с другими флавоноидами [17, 21]. Однако кверцетин может оказывать и про-оксидантный эффект на опухолевые клетки, в частности, посредством образования семихинонного радикала и истощения пула восстановленного глутатиона, что приводит к окислительному стрессу и гибели клеток [248].

Исследование действия кверцетина на клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP позволило установить снижение их жизнеспособности в зависимости от концентрации и времени инкубации (рис. 10 б, в; таблица 5).

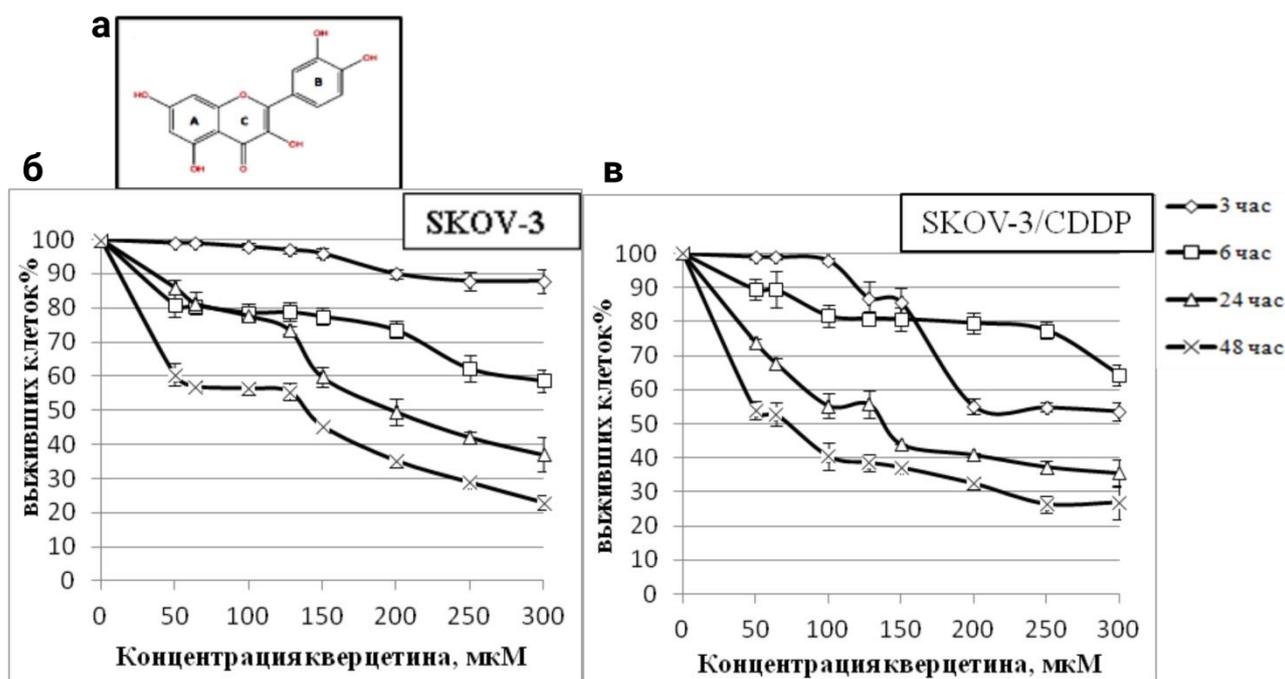


Рис. 10. Влияние кверцетина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к CDDP клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации (3, 6, 24 и 48 ч).

Таблица 5. Оценка цитотоксичности (IC_{50} , мкМ) действия кверцетина, цисплатина и на чувствительные и резистентные клетки SKOV-3.

Условия инкубации	SKOV-3	SKOV-3/CDDP
CDDP (72 ч)	10 ± 0.8	35 ± 0.6
Кверцетин (3 ч)	>300	>300
Кверцетин (6 ч)	>300	>300
Кверцетин (24 ч)	180 ± 2.0	100 ± 2.0

Чтобы определить, снижает ли преинкубация с QU устойчивость клеточной линии SKOV3/CDDP к CDDP, мы разработали альтернативную стратегию преинкубации с QU, чтобы сравнить ее с классической индивидуальной инкубацией с QU или CDDP, предполагая, что инкубация только с QU или с CDDP не оказывает эффекта и значительный эффект проявляется только при их совместном действии (рис. 11 а).

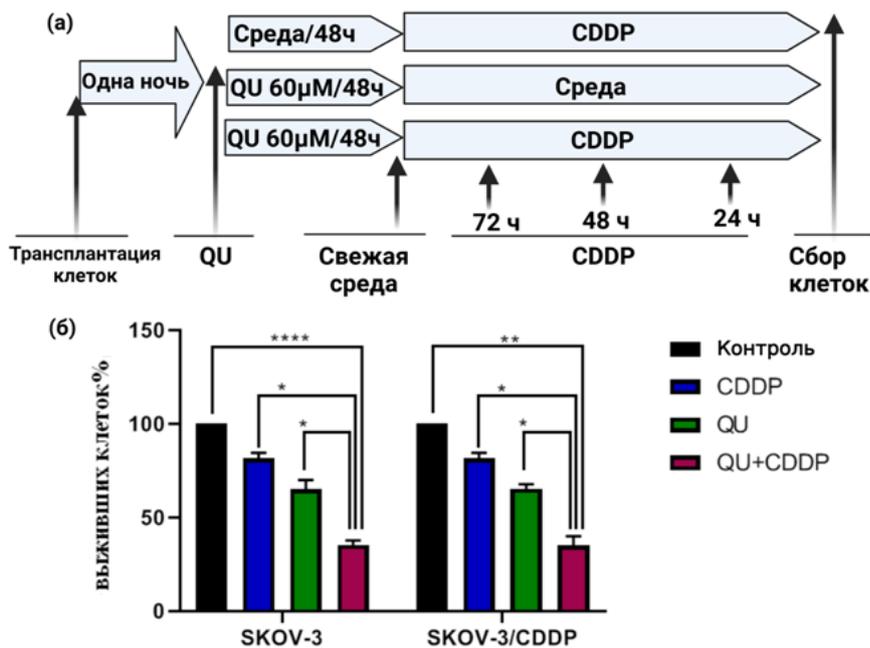


Рис. 11. Влияние QU на жизнеспособность клеток SKOV3 и SKOV3/CDDP. (а) Разработка стратегии прединкубации с QU. Оба типа клеток инкубировали либо только с CDDP в течение 24, 48 и 72 часов, либо с QU в течение 48 ч с последующей заменой свежей средой еще в течение 24, 48 и 72 ч, либо предварительно обрабатывали QU в течение 48 ч с последующим действием CDDP в течение дополнительных 24, 48 и 72 ч после смены среды. (б) Влияние прединкубации с QU на эффективность действия CDDP. Оба типа клеток инкубировали с QU (60 мкМ) в течение 48 часов, затем в свежей среде в течение 72 ч и/или с CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP) в течение 72 ч. * $p = 0,05/0,01$, ** $p = 0,005$, **** $p = 0,0001$.

Основываясь на наших данных, мы решили использовать оптимальные минимальную и максимальную эффективные дозы QU и CDDP в качестве эталонных значений для QU (15 и 100 мкМ) в течение 24 часов [89] (рис. 12).

Однако мы обнаружили, что длительная предварительная инкубация со значительно нетоксичной умеренной дозой (60 мкМ) QU в течение 48 часов 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 ($1/2 IC_{50}$) 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. 11б).

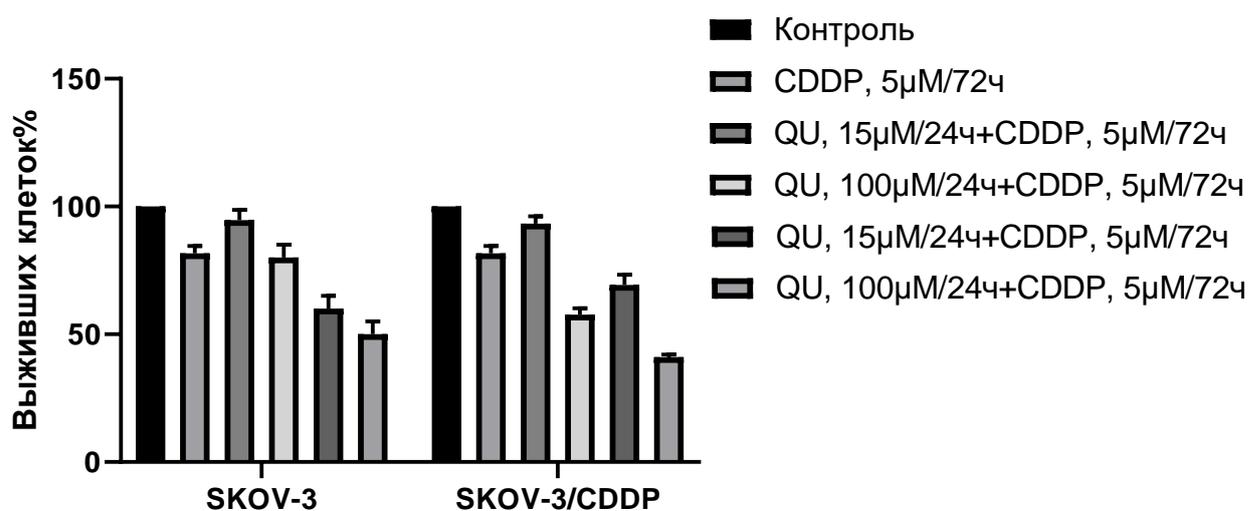


Рис. 12. Влияние прединкубации с QU на эффективность действия CDDP. Оба типа клеток обрабатывали низкой и высокой концентрацией QU (15 или 100 мкМ) в течение 24 ч с последующей заменой на свежую среду в течение 72 ч или/и с CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP) в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа. Все данные представлены как среднее \pm SEM.

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. 13). Использование МТТ анализа позволило установить снижение количества преобработанных QU клеток при использовании CDDP в концентрации 34 мкМ (IC_{50} для SKOV-3/CDDP) и 17 мкМ ($1/2 IC_{50}$ для SKOV-3) (рис. 13). Для сублинии SKOV-3/CDDP нетоксичная концентрации 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 клеток (снижение на 65% при концентрации CDDP 17 мкМ в течение 72 ч; $p < 0,005$), по сравнению с действием только CDDP (17 мкМ; снижение на 20%) и QU (60 мкМ; снижение на 35%) (рис. 116). Эти данные показали, что прединкубация с QU с последующим применением CDDP вызывает эффективное подавление выживаемости в обоих типах клеток рака яичников.

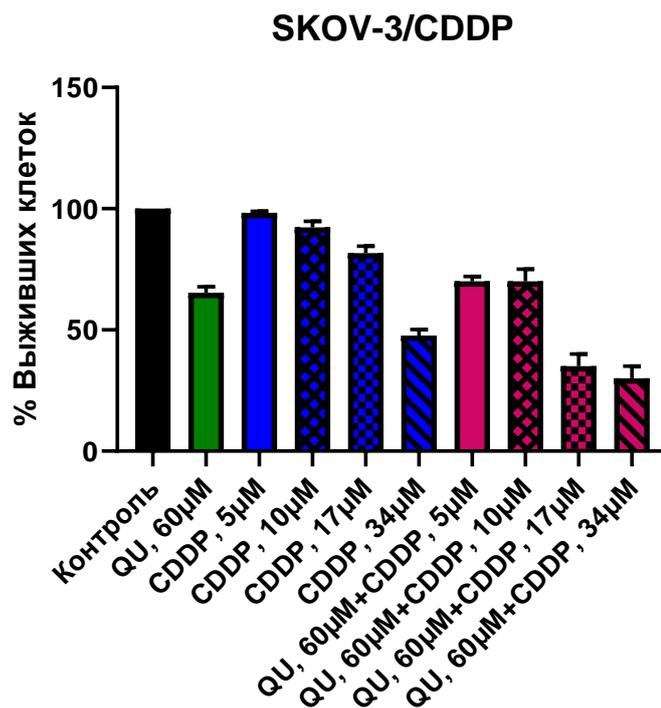


Рис. 13. Влияние прединкубации с QU на эффективность действия CDDP. Клетки SKOV-3/CDDP обрабатывали с QU (60 мкМ) в течение 48 ч с последующей заменой на свежую среду в течение 72 ч или/и с CDDP (5, 10, 17 и 34 мкМ) в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа.

3.2.2. 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 на SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетки оценивали по содержанию клеточной ДНК с использованием PI-окрашивания для проточной цитометрии (рис. 14 и 15). Влияние QU (15 мкМ и 100 мкМ) на клеточный цикл оценено после инкубации в течение 24 ч с. Установлено, что при 15 мкМ кверцетин практически не влиял на распределение фаз цикла клеток SKOV-3, однако повышал долю SKOV-3/CDDP клеток в S фазе (рис. 14 а, б). Повышение концентрации кверцетина 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 14 в, г). При длительном инкубационном периоде (преимущественно 48 ч) QU существенно задерживал клеточный цикл в фазе G1/S и при этом не оказывал токсического действия даже после 72 ч инкубации (рис. 15).

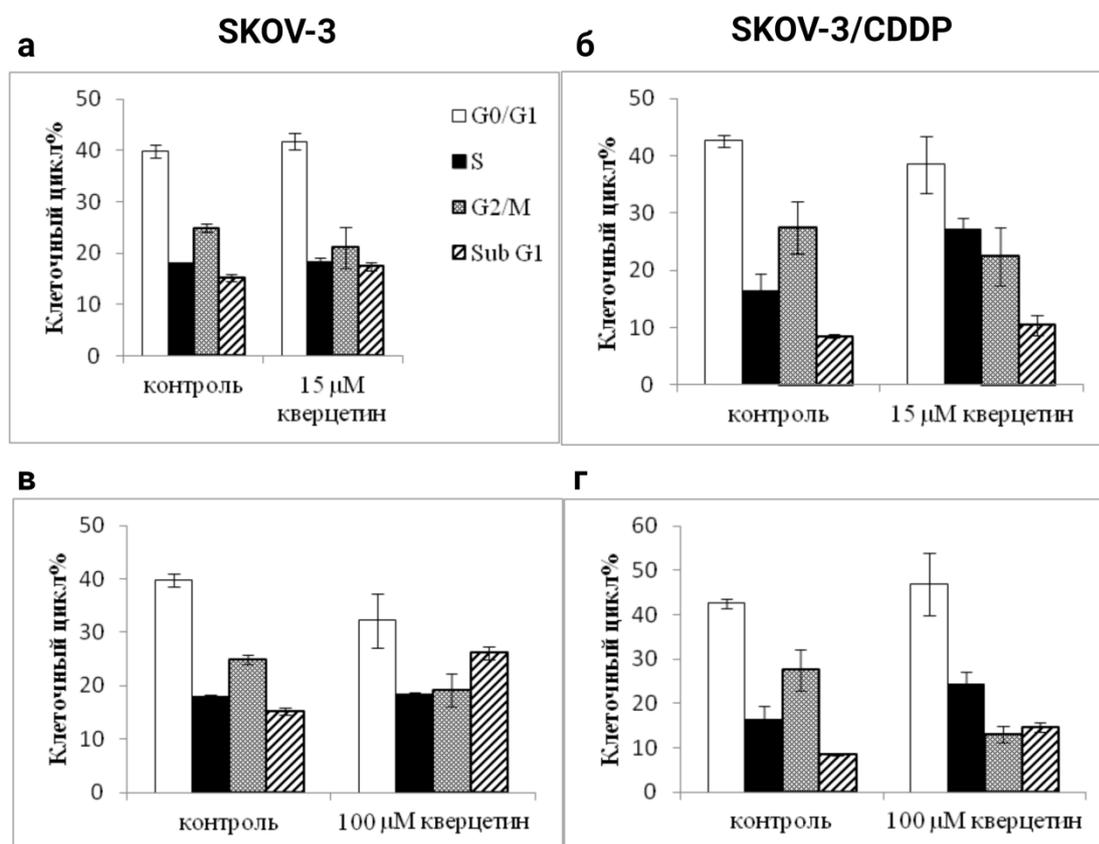


Рис. 14. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 (а, в) и SKOV-3/CDDP (б, г) при действии QU (15 и 100 мкМ, 24 ч), анализируются результаты трёх независимых экспериментов. * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем.

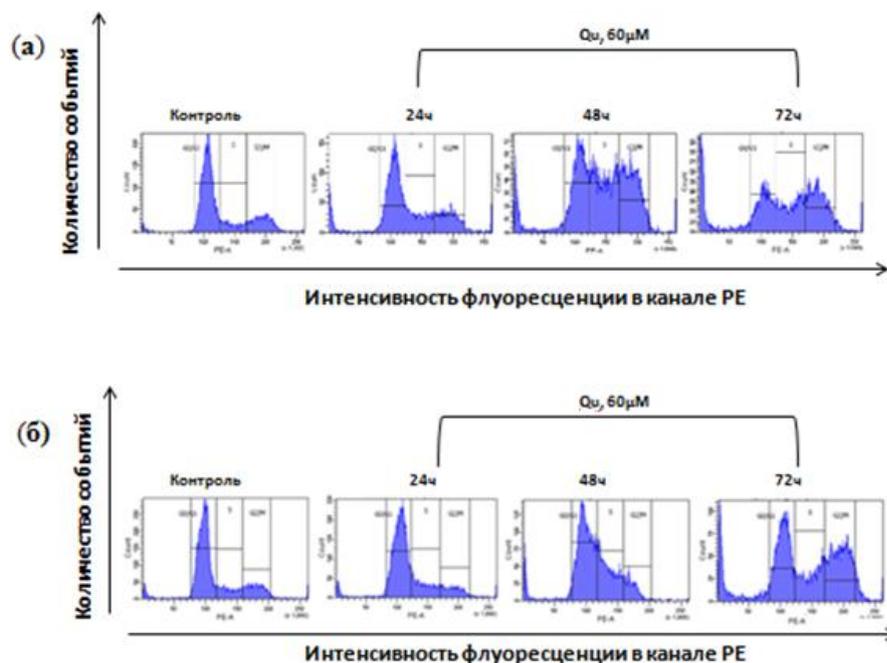


Рис. 15. Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии клеточного цикла опухолевых клеток (а) SKOV-3 и (б) SKOV-3/CDDP, обработанных QU (60 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч.

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 ($1/2 IC_{50}$ SKOV-3) вызывает арест клеток SKOV-3 в S-фазе (рис. 16а), тогда как при более высокой концентрации 17 мкМ ($1/2 IC_{50}$ SKOV-3/CDDP) 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. 16б). 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. 16). Таким образом, влияние CDDP на распределение клеточного цикла в клетках, предварительно обработанных QU, заключалось в индукции накопления в суб-G1, что указывает на деградацию хроматина, связанную с апоптозом, и остановке клеточного цикла в G2/M или S фазах.

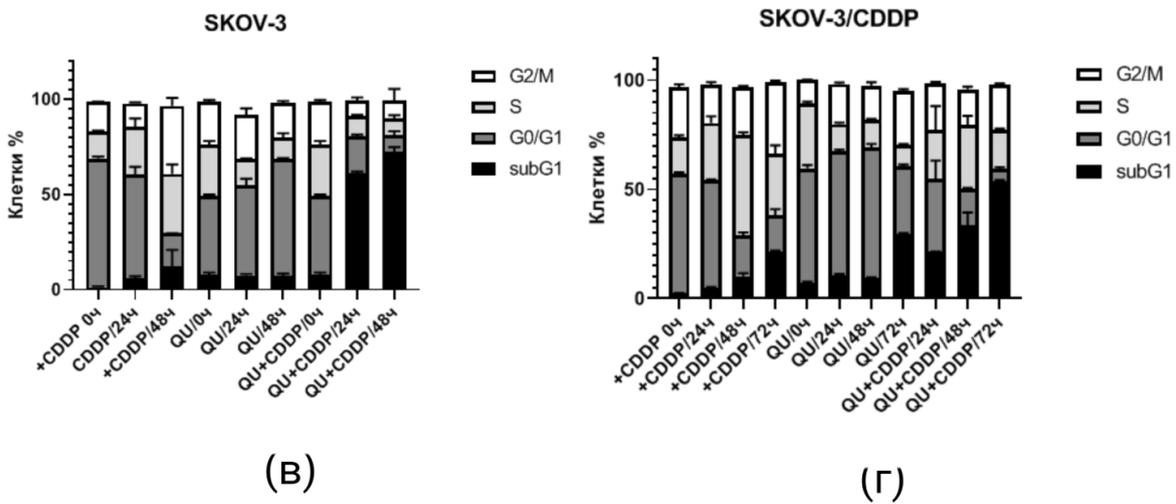
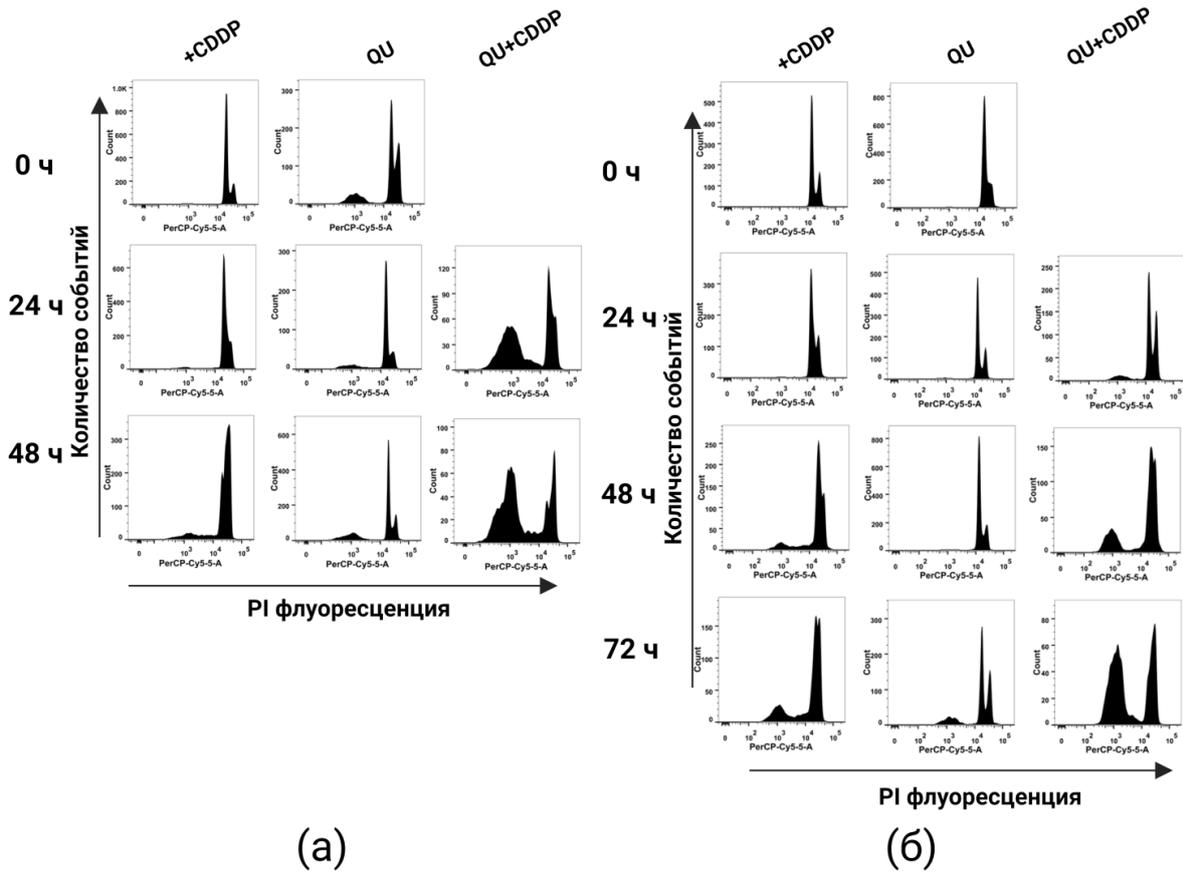


Рис. 16. Прогрессирование клеточного цикла клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, обработанных QU и/или CDDP. Клетки инкубировали с QU (60 мкМ) в течение 48 ч, а затем добавляли свежую среду и/или CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP) для дальнейшей инкубации в течение 24, 48 и 72 ч. Последующий анализ содержания клеточной ДНК проводили методом проточной цитометрии с окрашиванием PI. Типичные точечные диаграммы проточной цитометрии: SKOV-3 (а) и SKOV-3/CDDP (б). Репрезентативные гистограммы проточной цитометрии: SKOV-3 (в) и SKOV-3/CDDP (г).

Для клеток SKOV-3 предварительная обработка QU приводит к значительному повышению их содержания в суб-G1, которое возросло с $61 \pm 1\%$ через 24 ч до $72,4 \pm 2\%$ через 48 ч (рис. 16 в). Тогда как процент клеток SKOV-3/CDDP в суб-G1 фазе через 72 ч составил только $53,5 \pm 0,7\%$ (рис. 16 г).

В дополнение к стратегии преинкубации, мы изучили синергетический подход, добавляя QU и CDDP одновременно в течение 24, 48 и 72 ч, и проанализировали влияние такой комбинации на клеточный цикл. Неожиданно результаты оценки клеточного цикла показали, что синергетический подход в SKOV-3/CDDP приводит к остановке клеточного цикла в фазах G2/M или S без значительного увеличения фазы суб-G1 даже после длительной инкубации (рис.17). С другой стороны, предварительная обработка QU значительно повышала процент клеток в фазе суб-G1 и чувствительность устойчивых к CDDP клеток SKOV-3/CDDP к CDDP даже после замены QU на свежую среду в течение длительного периода - 24, 48 и 72 ч.

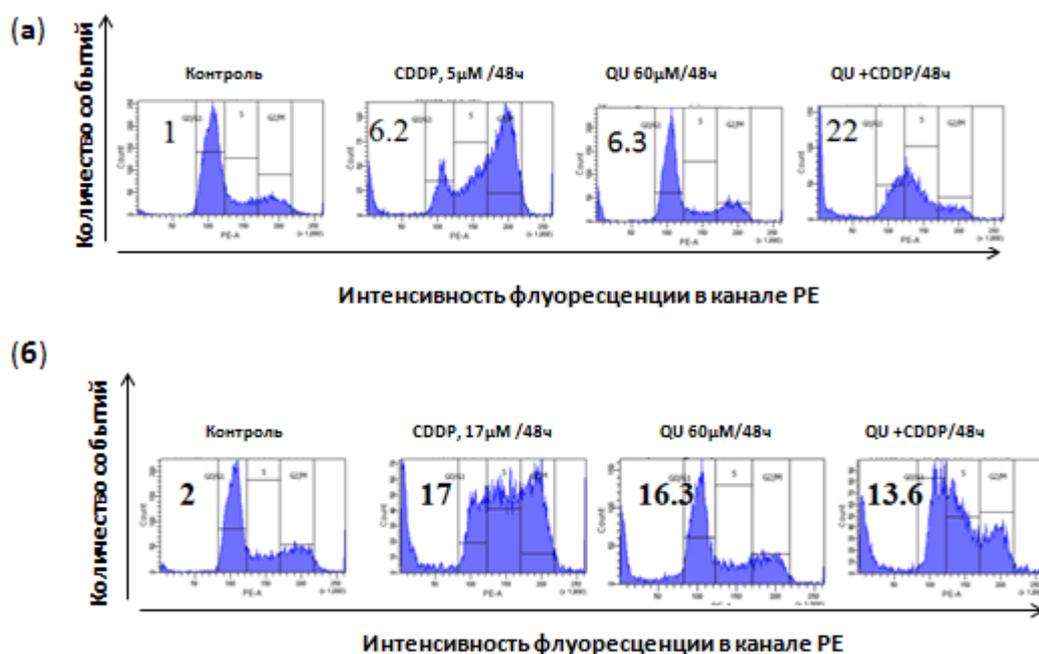


Рис. 17. Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии клеточного цикла опухолевых клеток SKOV-3 (а) и SKOV-3/CDDP (б), обработанных только QU (60 мкМ) или CDDP (5 мкМ для SKOV-3 и 17 мкМ для SKOV-3/CDDP) и их комбинацией в течение 48 ч.

3.2.3. 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. 18).

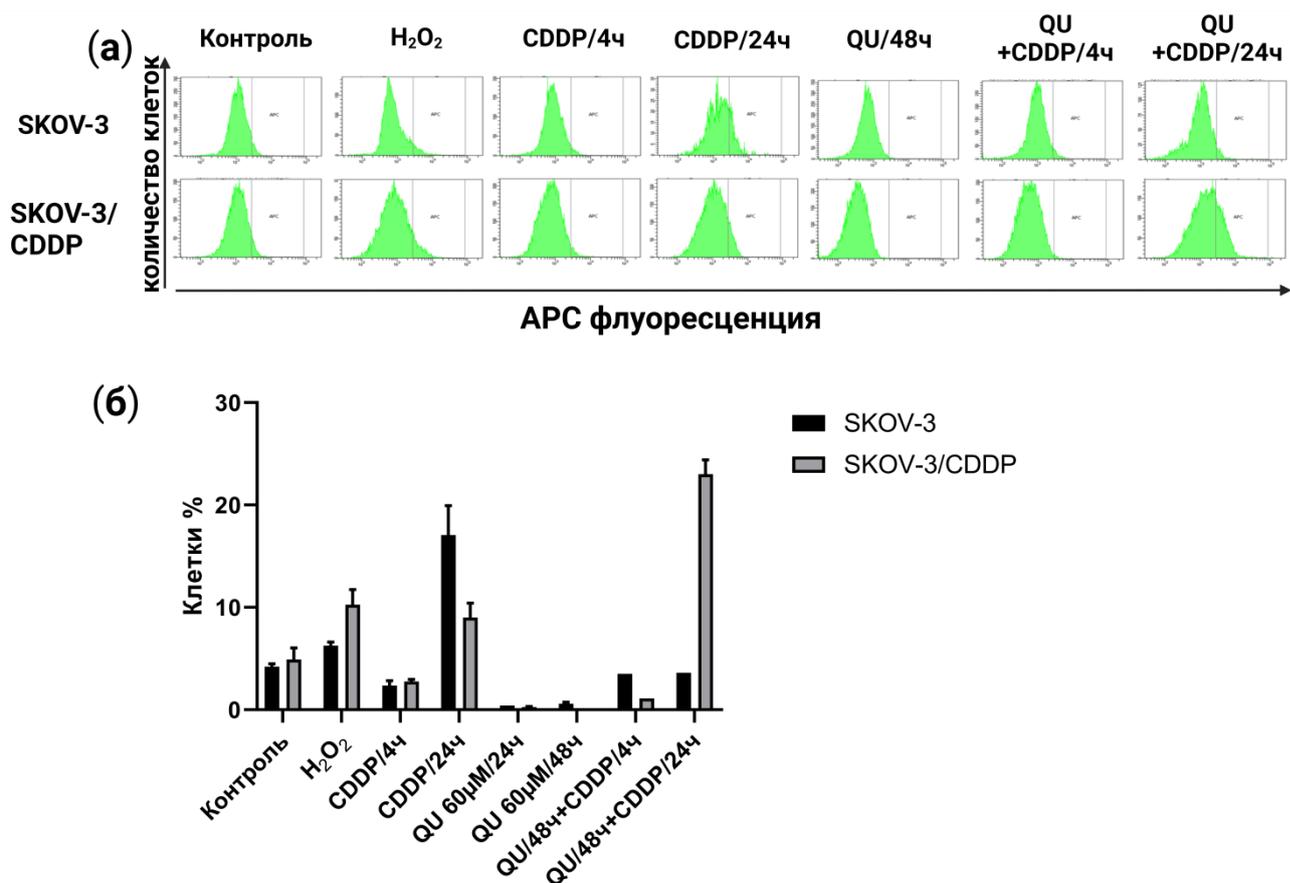


Рис. 18. Оценка АФК методом проточной цитометрии в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии QU и CDDP. (а) Внутриклеточный уровень АФК при инкубации клеток только с QU или CDDP и при прединкубации с QU. (б) Количественный анализ CellROX Deep Red-позитивных клеток. Оба типа клеток инкубировали либо с QU (60 мкМ, 48 ч), либо с CDDP (5 или 17 мкМ, 24 ч), либо при сочетании прединкубации с QU (60 мкМ, 48 ч) с последующим действием CDDP (5 или 17 мкМ для SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, соответственно, 24 ч). Оценка АФК проведена с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red.

В ходе исследования нами было предположено, что преинкубация 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. 18). 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. 18). Через 24 ч инкубации CDDP (рис. 18 б) 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 3 раза, что может объясняться высоким уровнем антиоксидантной системы в резистентных клетках [89].

Преинкубация с QU снижала эффект CDDP за счет снижения внутриклеточного уровня АФК до контрольного в клетках SKOV-3 (рис. 18 б). 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 преинкубация с QU приводила к значительному повышению сигнала ($23 \pm 1\%$ флуоресцентных клеток) (рис. 18 б).

Полученные результаты демонстрируют усиление прооксидантного эффекта CDDP при преинкубации с QU в клетках SKOV-3/CDDP. Интересно, что это полифенольное соединение оказывает антиоксидантное действие через 24 и 48 ч инкубации и прооксидантное действие только в группе с преинкубацией QU. Эти результаты подтверждают предположение о том, что предварительная обработка QU повышает чувствительность резистентных клеток SKOV-3/CDDP к CDDP, индуцируя генерацию АФК, что способствует накоплению клеток SKOV-3/CDDP в суб-G1 фазе.

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

Для оценки действия QU были выбраны две концентрации: низкая - 15 мкМ и высокая - 100 мкМ ($IC_{50}/24$ ч для клеток SKOV-3/CDDP).

Действие кверцетина (15 и 100 мкМ) в течение 24 часов вызывает также диаметрально противоположное изменение экспрессии генов изоформ Trx и TrxR в чувствительных и резистентных клетках (рис.19). В чувствительных клетках SKOV-3 наблюдается увеличение экспрессии генов TRX1, TRXRД1 и TRXRД2 - в 4, 3,5 и 7 раз при 100 мкМ (рис. 19). 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. 19).

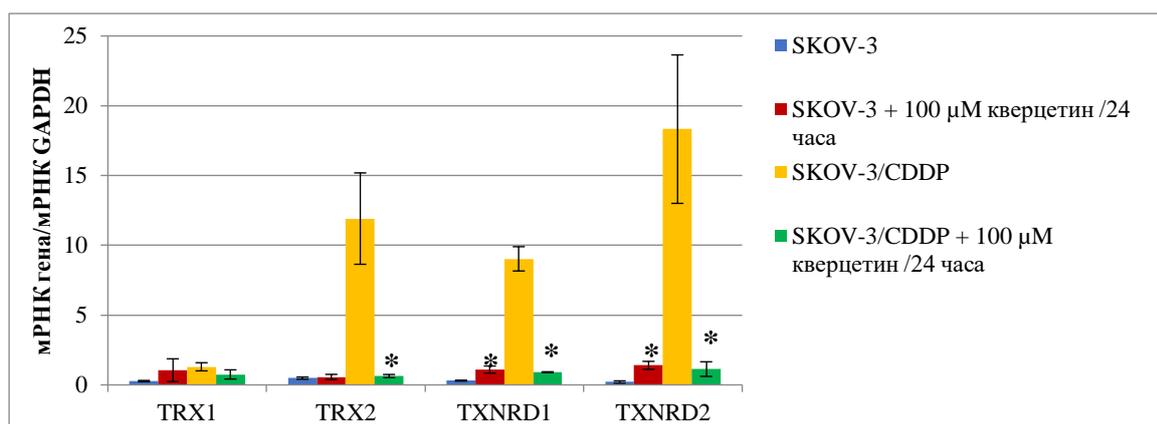


Рис. 19. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (TRX1, TRX2) и TrxR (TRXRД1, TRXRД2) в чувствительных SKOV-3 и резистентных к цисплатину SKOV-3/CDDP клетках после действия кверцетина (100 мкМ) в течение 24 часов.

*значения считаются статистически достоверными по отношению к контролю – клеткам SKOV-3 или SKOV-3/CDDP, $p < 0,05$.

Действие кверцетина вызывало аналогичное изменение профиля экспрессии генов изоформ Prx (PRDX2, PRDX3), активность которых сопряжена с функциональной активностью Trx-зависимой системы. 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. 20).

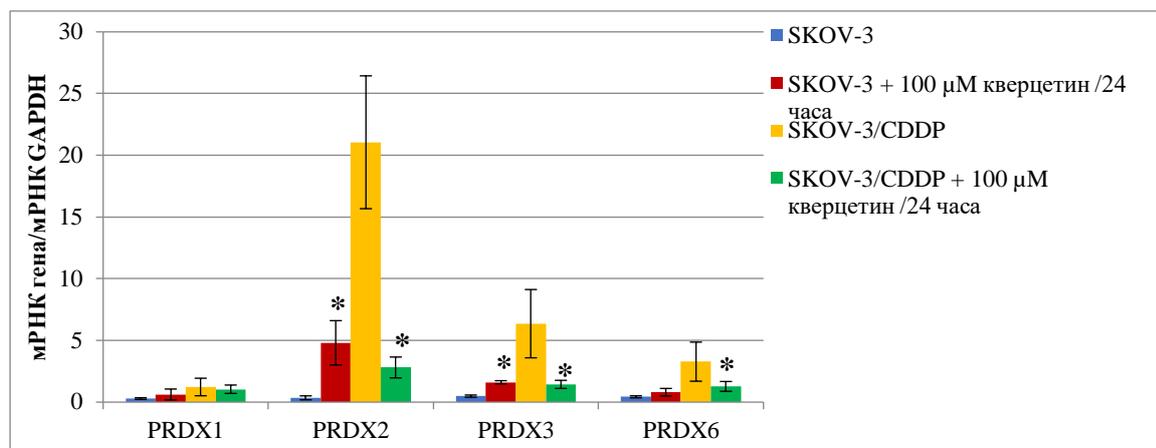


Рис. 20. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6) в чувствительных (SKOV-3) и резистентных к цисплатину (SKOV-3/CDDP) клетках после действия кверцетина (100 мкМ) в течение 24 часов.

*значения считаются статистически достоверными по отношению к контролю – клеткам SKOV-3 или SKOV-3/CDDP, $p < 0,05$.

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. 21 а). В клетках SKOV-3 экспрессия генов *PI3K*, *AKT*, *MTOR* повышалась в 2, 6,5 и 2 раза при 100 мкМ (рис. 21 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. 21 б). В резистентных клетках при действии QU (100 мкМ экспрессия всех генов значительно снижалась (рис. 21 б).

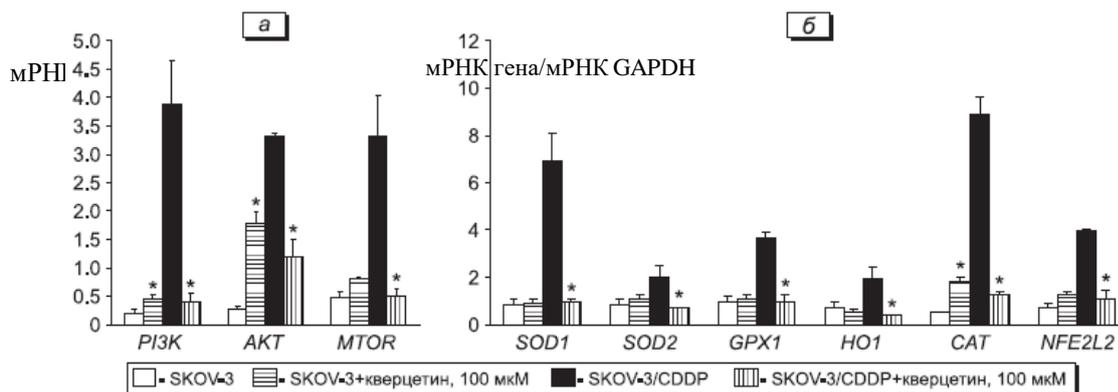


Рис. 21. Влияние кверцетина (100 мкМ, 24 ч) на экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (а), антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *HO-1*) и транскрипционного фактора Nrf2 (б) в клетках SKOV3 и SKOV3/CDDP. * $p < 0.05$ по сравнению со значениями без кверцетина ($n=4$).

3.2.5. Влияние кверцетина на внутриклеточный уровень белков антиоксидантной системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках SKOV3/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 сигнального пути, было исследовано изменение уровня белков, связанных с контролем чувствительности к CDDP, с помощью вестерн-блоттинг анализа. Установлено, что уровень важной антиоксидантной системы Trx/TrxR, а также сигнального пути mTOR/STAT3 был значительно выше в клетках устойчивой сублинии SKOV-3/CDDP по сравнению с родительскими клетках SKOV-3 (рис. 20, а-в). Это позволяет предположить, что гиперэкспрессия таких белков вносит существенный вклад в развитие устойчивости клеток SKOV-3/CDDP CDDP.

Ранее на клетках SKOV-3 и резистентной сублинии SKOV-3/CDDP нами был проведен анализ действия двух концентраций QU (15 мкМ и 100 мкМ) на модуляцию экспрессии генов антиоксидантных ферментов (*SOD-1*, *SOD-2*, *Gpx-1*, *CAT* и *HO-1*), транскрипционного фактора Nrf2 и киназ сигнального пути (PI3K/Akt/mTOR) [89].

Далее мы проанализировали 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 CDDP, наибольший ингибирующий эффект на клетки сублинии SKOV-3/CDDP, приводящее к повышению их чувствительности к CDDP, сопровождался изменением во внутриклеточном уровне белков, которое наблюдалось после прединкубации с QU (60 мкМ, 48 ч) с последующим действием CDDP на клетки SKOV-3/CDDP (17 мкМ, 48 ч) в сравнении клетками SKOV-3 (5 мкМ, 24 ч) (рис. 22 а, б, г, д). 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.

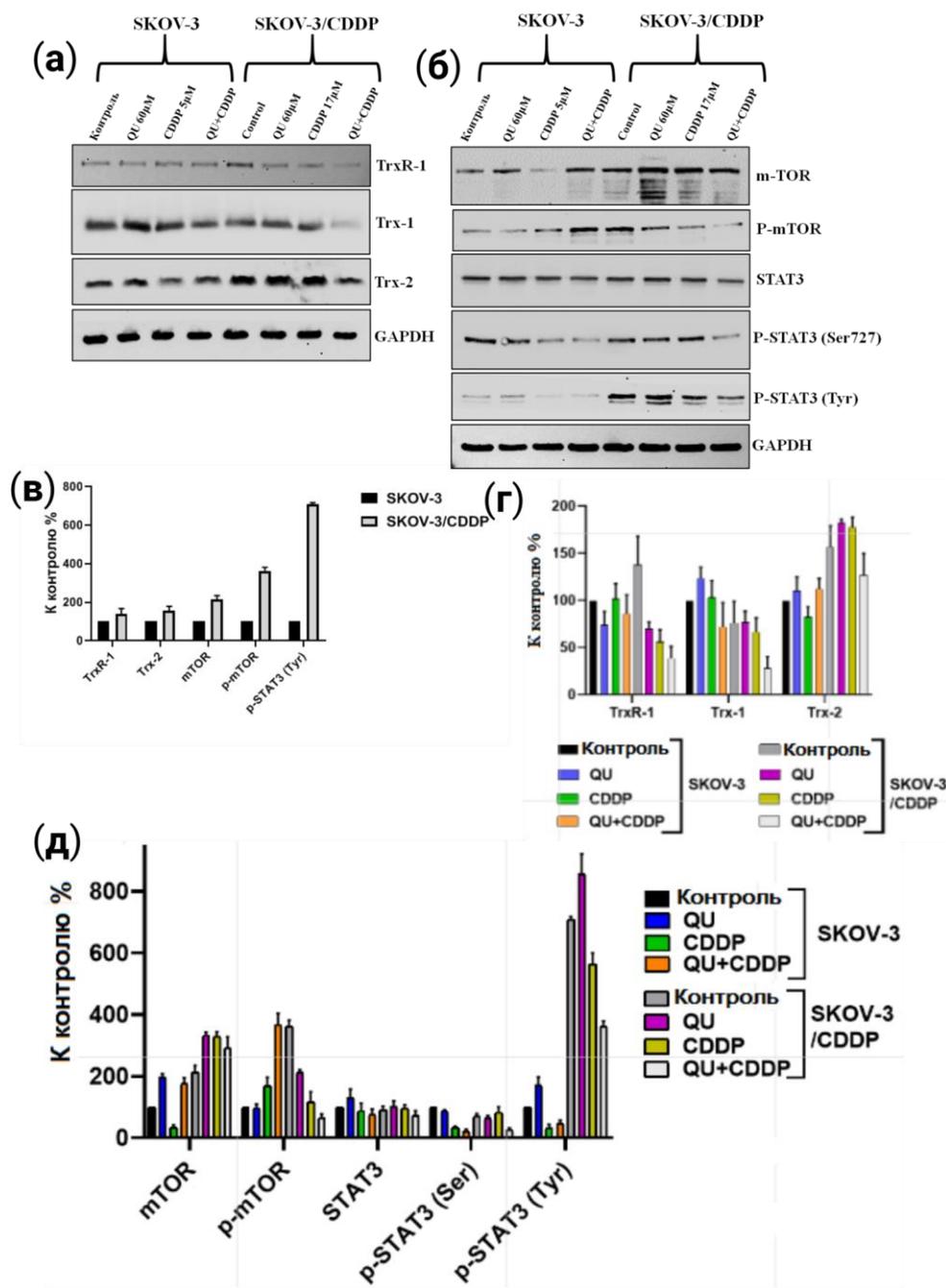


Рис. 22. Вестерн-блоттинг анализ влияния преинкубации с QU на внутриклеточный уровень белков системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP. Внутриклеточный уровень белков (а) системы Trx/TrxR (б) сигнального пути mTOR/STAT3 в клетках SKOV-3/CDDP по сравнению с клетками SKOV-3 (в – д). Результаты денситометрии: (в) контроль - SKOV-3 и SKOV-3/CDDP; (д) система Trx/TrxR; (е) сигнальный путь mTOR/STAT3. Клетки обрабатывали: QU (60 мкМ, 48 ч), CDDP (5 мкМ, 24 ч или 17 мкМ, 48 ч) или преинкубация QU (60 мкМ) с последующим действием CDDP (5 мкМ, 24 ч или 17 мкМ, 48 ч) для клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, соответственно. GAPDH использовали в качестве контроля нагрузки. Значения представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 3$).

3.2.6. 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. 23 а, б).

Преинкубация с QU с последующим действием CDDP вызывала индукцию апоптоза с зависимым от времени ростом гибели клеток (рис. 23 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. 23 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. 23а). Тогда как сенсibilизация клеток SKOV-3/CDDP с помощью QU до введения в среду CDDP существенно повышала процент апоптоза в клетках SKOV-3/CDDP ($\sim 41,5 \pm 2\%$) по сравнению с действием только CDDP ($2 \pm 0,1\%$) через 48 ч (рис. 23 б).

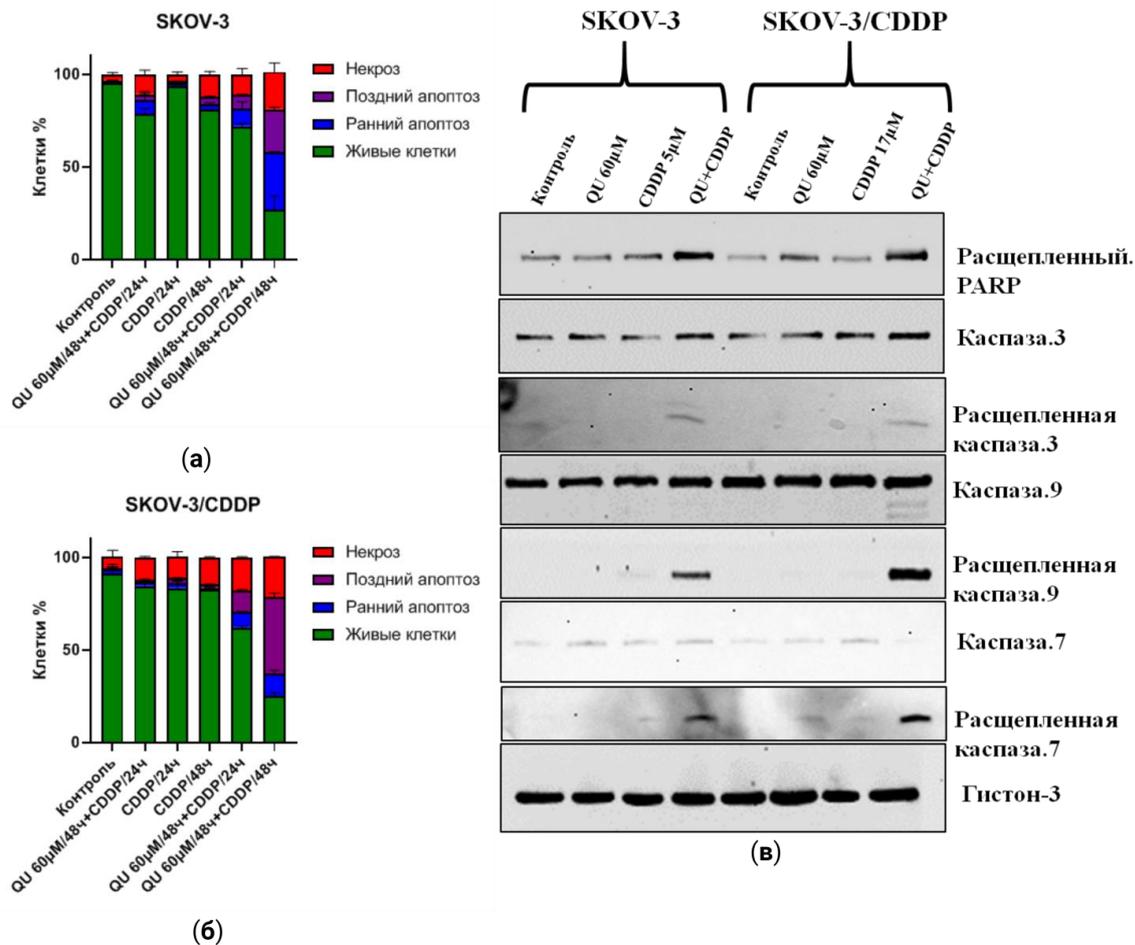


Рис. 23. Апоптоз, индуцированный QU-прединкубацией, в клетках рака яичников. Процент апоптотических клеток SKOV-3 (а) и SKOV-3/CDDP (б) после действия QU, CDDP и прединкубации с QU в течение 24 и 48 часов. (в) Репрезентативный вестерн-блоттинг анализ расщепленных каспаз-9,7,3 и С-PARP в клетках рака яичников, обработанных QU и/или CDDP. В качестве контроля загрузки использован гистон. Значения представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 3$).

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. По сравнению с гистоновым белком, контролирующим загрузку, уровни расщепленных каспаз-9, -7 и -3 в обоих типах клеток наблюдались только в случае прединкубации с QU, которая также вызывала высокий уровень расщепленного PARP в обеих клеточных линиях по

сравнению с монообработкой (рис. 23в). Полученные результаты демонстрируют, что предварительная обработка клеток с QU вызывает эффективное подавление клеточного роста за счет активации апоптоза. Гибель клеток опосредована ингибированием пути mTOR/STAT3 и стимуляцией АФК-опосредованной активации каспаз-3, -7 и -9.

3.3. Оценка влияния куркумина на Trx/TrxR систему и лекарственную устойчивость опухолевых клеток к цисплатину

3.3.1. Влияние куркумина на выживаемость клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

Следующий этап работы был связан с исследованием действия на редокс-зависимые механизмы лекарственной устойчивости другого ингибитора TrxR – куркумина (рис. 24 а).

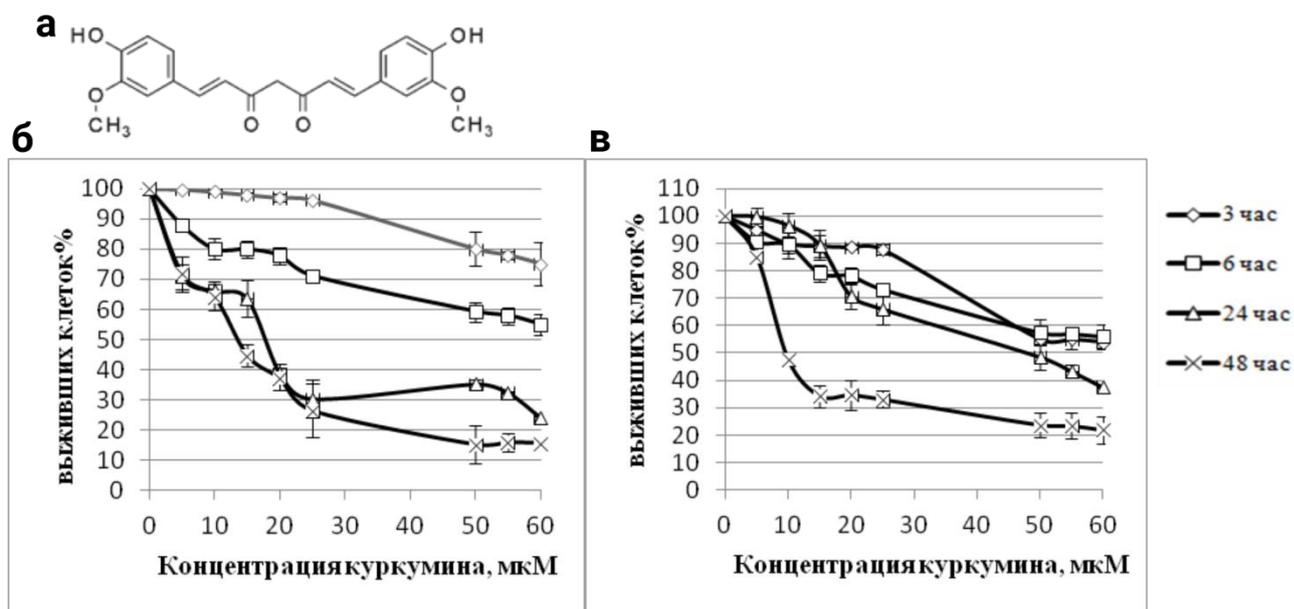


Рис. 24. Влияние куркумина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к цисплатину клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации (3, 6, 24 и 48 ч).

Обнаружено, что диарилгептаноид куркумин (диферулоилметан, основной компонент куркумы) может способствовать обращению фенотипа множественной лекарственной устойчивости, как предполагают, в результате подавления экспрессии гена Р-гликопротеина *MDR1* [47]. Куркумин может

повышать чувствительность клеток к гибели, вызванной цисплатином, посредством модуляции экспрессии генов белков, участвующих в формировании множественной лекарственной устойчивостью, таких как *MRP1* и *MDR1* [220]. Помимо подавления ряда сигнальных путей, связанных с инвазией и метастазированием рака [140], куркумин может необратимо ингибировать TrxR.

Нами установлено, что действие куркумина (рис. 24 а) вызывает зависимое от концентрации и времени инкубации снижение жизнеспособности как родительских, так и устойчивых к CDDP клеток SKOV-3 (рис. 24 б,в; таблица 6).

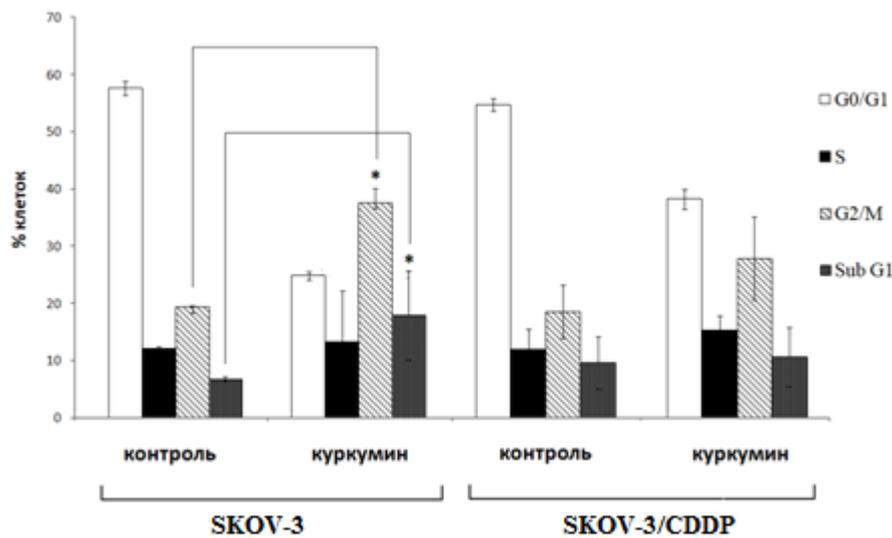
Таблица 6. Оценка цитотоксичности (IC_{50} , мкМ) куркумина, цисплатина и их комбинации в отношении чувствительных и резистентных клеток SKOV3

Условия инкубации	SKOV-3	SKOV-3/CDDP
CDDP, 72 ч	10 ± 0.8	34 ± 0.6
Куркумин, 3 ч	>50	>50
Куркумин, 6 ч	>50	>50
Куркумин, 24 ч	17 ± 0.7	47 ± 0.7
17 мкМ куркумин, 3 ч + CDDP, 72 ч	4.9 ± 0.6	16.5 ± 0.4

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

А



Б

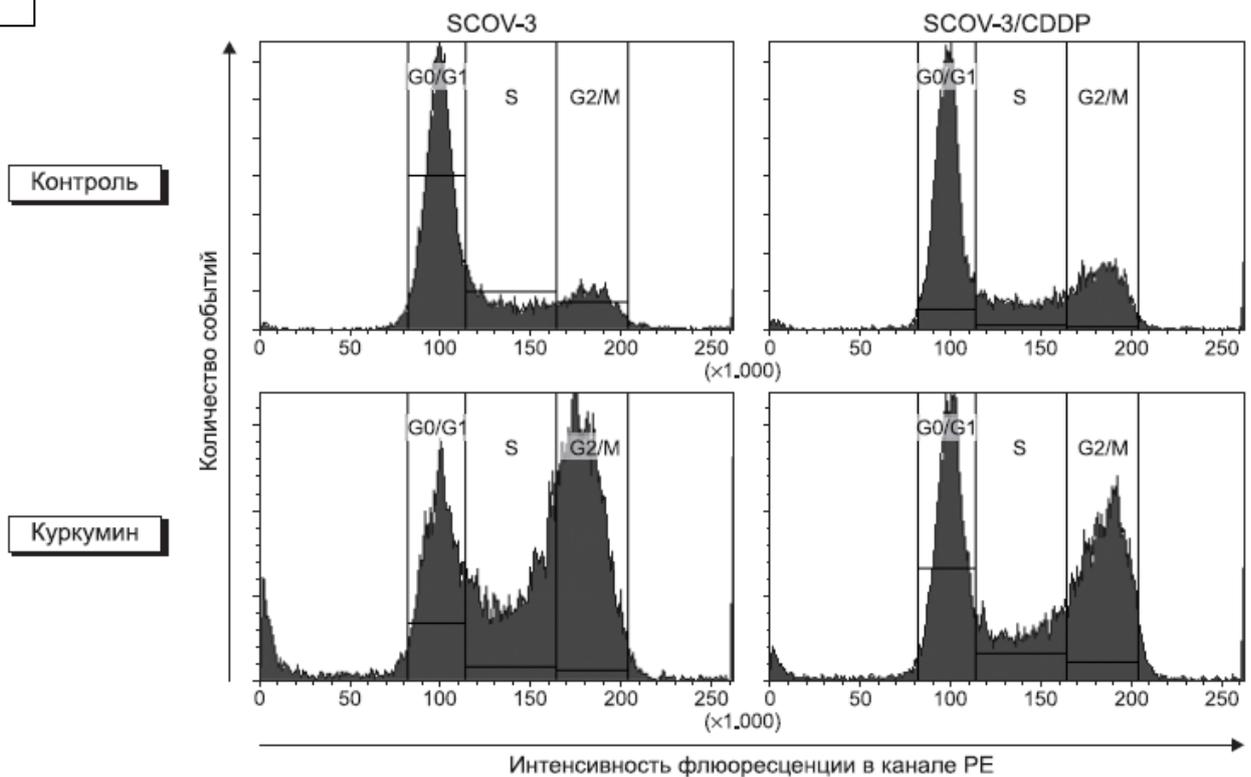


Рис. 25. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии куркумина (17 мкМ, 24 ч). *а* — гистограммы интенсивности флуоресценции йода да пропидия (PI); представлены результаты одного из трёх независимых экспериментов со схожими результатами. *б* — доля клеток в каждой фазе; анализируются результаты трёх независимых экспериментов. * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем.

3.3.3. 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 влияния куркумина на экспрессию генов Trx/TrxR системы. Для оценки действия куркумина были выбраны две концентрации 6 мкМ и 17 мкМ ($IC_{50}/24$ ч для клеток SKOV-3) и время инкубации 24 ч.

При высокой концентрации 17 мкМ в резистентных клетках происходит резкое снижение их экспрессии: TRX2 - в 7.5 раз, TRXRД1, TRXRД2 – в 8 и 11 раза, соответственно (рис. 26).

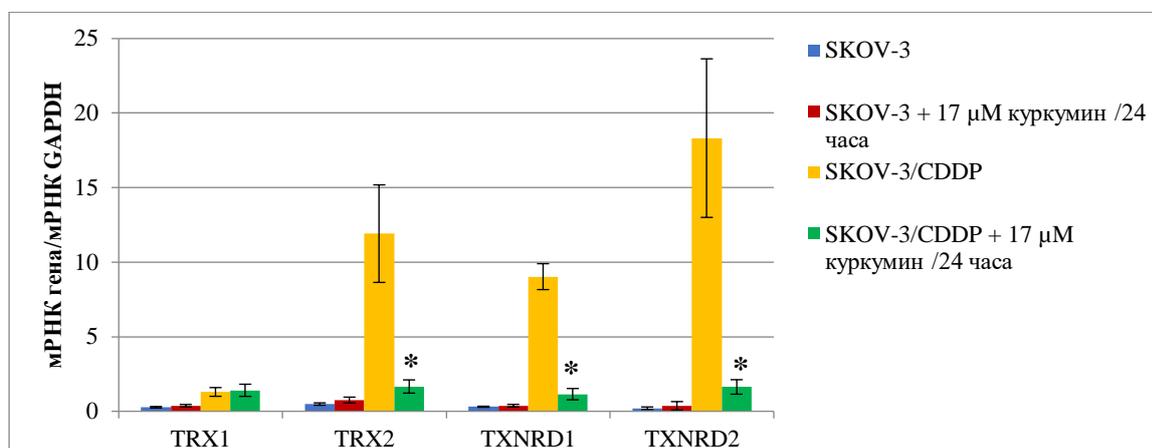


Рис. 26. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Trx (TRX1, TRX2) и TrxR (TRXRД1, TRXRД2) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках после действия куркумина (17 мкМ) в течение 24 ч.

*значения считаются статистически достоверными по отношению к контролю – клеткам SKOV-3 или SKOV-3/CDDP, $p < 0,05$.

Действие куркумина вызывало аналогичные изменения профиля экспрессии генов изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6), которые также наблюдались при действии кверцетина. 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 (рис.27).

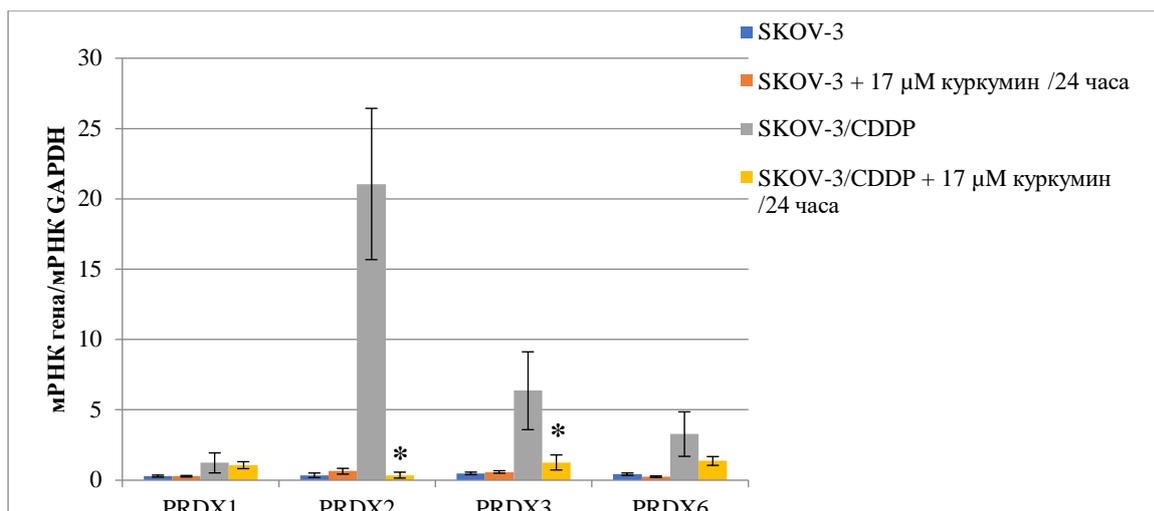


Рис. 27. Real-time RT-PCR анализ мРНК изоформ Prx (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6) в SKOV-3 и SKOV-3/CDDP клетках после действия куркумина (17 мкМ) в течение 24 ч.

*значения считаются статистически достоверными по отношению к контролю – клеткам SKOV-3 или SKOV-3/CDDP, $p < 0,05$.

В клетках SKOV-3 установлен рост экспрессии генов PI3K, в 2 раза под действием 17мкМ, тогда как экспрессия гена АКТ практически не менялась под действием 17 мкМ (рис.28), экспрессия гена МTOR оставалась без изменений. В клетках SKOV-3/CDDP наблюдается, напротив, значительное снижение экспрессии генов PI3K, АКТ, МTOR: в 3, 5 и 6.5 раз при действии 17мкМ (рис.28 а).

При окислительном стрессе ядерная транслокация Trx1 активирует фактор транскрипции Nrf2, связанный с выживанием и пролиферацией клеток и контролирующей при окислительном стрессе как ферментативные, так и неферментативные (синтез GSH) антиоксидантные системы [23, 223].

При 17 мкМ не обнаружено достоверного изменения экспрессии этих генов, за исключением небольшого снижения экспрессии гена *SOD2* (рис. 28 б).

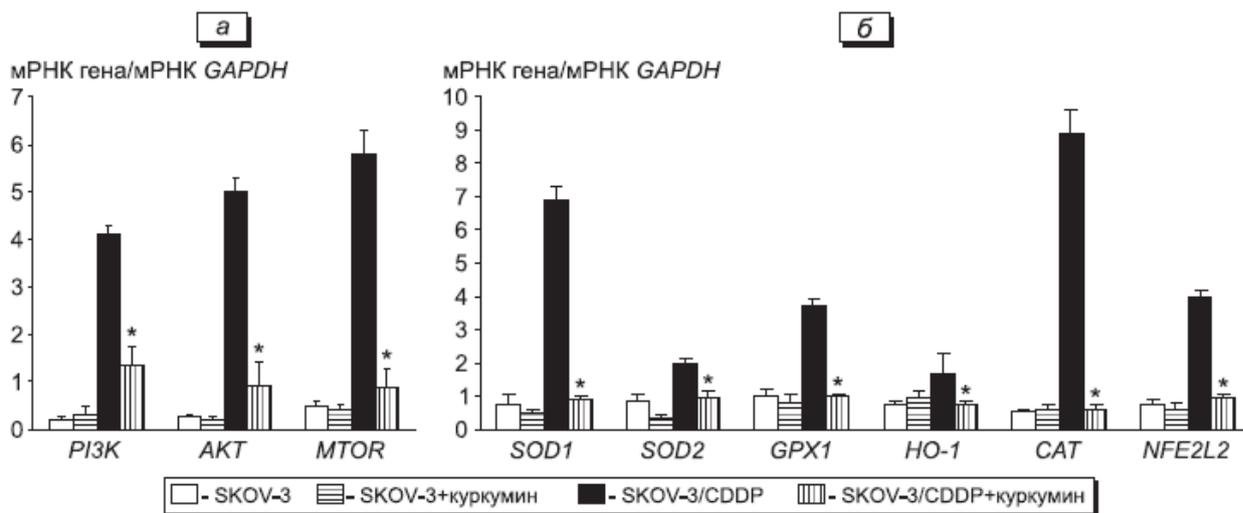


Рис. 28. Влияние куркумина (17 мкМ, 24 ч) на экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (а) и ключевых антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *HO-1*), транскрипционного фактора Nrf2 (б) в чувствительных SKOV3 и резистентных SKOV3/CDDP клетках. * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующими значениями без добавления куркумина ($n=4$).

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. 28 а, б).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Рак яичников является постоянной проблемой здравоохранения, на которую приходится значительная часть смертности среди женщин во всем мире [179, 272]. В современной клинической практике хирургическое вмешательство в сочетании с химиотерапией на основе соединений платины считается стандартной стратегией лечения рака яичников [54]. CDDP — один из наиболее эффективных химиотерапевтических средств при раке яичников, однако резистентность к этому химиотерапевтическому препарату является основным препятствием для радикальной терапии рака. Развитие лекарственной устойчивости в опухолевых клетках яичника происходит посредством различных механизмов, включая репарацию ДНК, клеточный метаболизм, окислительный стресс, регуляцию клеточного цикла, пути апоптоза и аномальные сигнальные пути [302].

Благодаря своей способности проявлять антиоксидантные, противовоспалительные, антипролиферативные, антиангиогенные, антиметастатические и проапоптотические свойства полифенолы являются потенциальными кандидатами в терапевтические средства при злокачественных новообразованиях в сочетании с классическими противоопухолевыми препаратами, такими как цисплатин [275]. Исследование механизмов действия полифенолов, позволяющих снижать резистентность к CDDP, является важным направлением в поиске путей повышения эффективности химиотерапии рака. Однако роль полифенолов в преодолении устойчивости клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 к CDDP все еще остается малопонятной.

В нашей работе мы сосредоточили внимание на влиянии куркумина [115] и QU [89] на клеточную линию аденокарциномы яичника SKOV-3 и ее устойчивую сублинию SKOV-3/CDDP, что позволило первоначально установить базовый уровень оценки их влияния по отношению к нашему более позднему исследованию. Нами было предположено, что предварительное воздействие полифенольных соединений (CUR или QU) может снизить резистентность к

CDDP клеток SKOV-3/CDDP. Оптимальные используемые концентрации для QU, CUR и CDDP были определены после оценки значений IC_{50} на основе наших ранее опубликованных данных [89, 115]. Преинкубация с QU в низкой (15 мкМ) и высокой (100 мкМ) концентрациях в течение 24 ч с последующим использованием CDDP показала антипролиферативный эффект как в клетках дикого типа SKOV-3, так и в резистентных клетках SKOV-3/CDDP, что указывает на сенсibilизацию резистентной сублинии к цитотоксическому действию CDDP (рис. 12). Более длительная инкубация (48 ч) вызывала максимальный антипролиферативный эффект (рис. 11b). Преинкубация с куркумином (17 мкМ) в течение 24 ч с последующим внесением в инкубационную среду CDDP аналогично приводила к антипролиферативному эффекту в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, что также свидетельствует о повышении чувствительности резистентной сублинии к CDDP (таблица 6).

Ранее установлено, что преинкубация клеток лейомиосаркомы с эпигаллокатехин-3-галлатом, полифенольным соединением, в течение 24 ч не оказывает влияние на индуцированный действием CDDP арест клеточного цикла в S-фазе и эффект CDDP на функциональную активность митохондрий [61]. Однако недавно обнаружена высокая эффективность длительного предварительного действия пеметрекседа на клетки злокачественной мезотелиомы плевры в течение 48 ч, которое вызывало арест клеточного цикла в фазе G2/M, накопление стойких повреждений ДНК и индукцию фенотипа старения, тем самым повышая чувствительность опухолевых клеток к последующему действию CDDP [117].

На последующем этапе нашей работе установлено, что действие на клетки рака яичников QU (60 мкМ) в течение 24 ч приводит к небольшому повышению доли клеток в S-фазе клеточного цикла, тогда как более длительная инкубация (48 ч) существенно усиливает арест клеточного цикла в G1/S фазе (рис. 15). Длительное действие QU (48 ч) значительно усиливало накопление клеток в суб-G1 фазе после обработки с CDDP и вызывало сенсibilизацию сублинии SKOV-

3/CDDP к последующему действию CDDP (рис. 16 б, г). Ранее показано, что сенсibilизация клеток яичников к CDDP может наблюдаться, когда полифенолы, куркумин или QU, внесены в среду одновременно с CDDP, а также когда они добавлялись за 24 ч до начала действия CDDP [43]. В нашем исследовании были разработаны две стратегии (синергетическое действие и эффект преинкубации). Полученные результаты показали, что клетки SKOV-3/CDDP не могли войти в фазу суб-G1 даже после длительной инкубации с использованием синергетического подхода, в то время как клетки эффективно накапливались в суб-G1 при использовании стратегии преинкубации с QU (рис. 17).

Наша стратегия позволила перевести обработанные с QU клетки в S-фазу, при этом последующее действие CDDP после удаления QU из культуральной среды было достаточным для увеличения продолжительности S-фазы, что в свою очередь, привело к дальнейшему повреждению клеток. Оценка такой преинкубации с QU на CDDP-резистентных клетках демонстрирует более эффективное цитотоксическое действие CDDP.

Показано, что CUR может снижать пролиферацию устойчивых к CDDP и чувствительных клеток рака яичников человека, вызывая остановку клеточного цикла G2/M [287]. В нашей работе установлено, что максимальный эффект CUR наблюдается после 24-часовой инкубации, вызывая остановку клеточного цикла в G2/M фазе, что приводит к накоплению клеток в суб-G1 и активации апоптоза при последующем действии CDDP в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP.

Антиоксидантные или прооксидантные свойства полифенольных соединений в значительной степени зависят от количества и положения заместителей - гидроксильных групп, а также от их окислительно-восстановительной способности к хелатированию металлов (Cu, Fe). Так, большее количество гидроксильных групп, включая 3-ОН-группу С-кольца полифенолов, в присутствии ионов Cu(II) действуют как потенциальные противоопухолевые агенты с умеренной прооксидантной активностью, вызывая

повреждение ДНК за счет активации реакции Фентона. В противном случае небольшая прооксидантная активность полифенолов может действовать как профилактическое противоопухолевое средство, индуцируя клеточные антиоксидантные системы, включая антиоксидантные ферменты, и синтез низкомолекулярных антиоксидантов, таких как GSH [110].

В нашей работе QU не мог эффективно индуцировать генерацию АФК, тогда как действие одного CDDP слегка повышало уровень АФК в клетках SKOV/CDDP. Однако прединкубация с QU эффективно запускала генерацию АФК в резистентных клетках при последующем действии CDDP. Эти данные указывают на то, что усиление окислительного стресса, вызванное предварительной обработкой с QU, могло активировать апоптотический каскад в клетках SKOV-3/CDDP (рис. 18) и подавлять внутриклеточный уровень белков системы Trx/TrxR и сигнального пути mTOR/STAT3 (рис. 20 a,b,d,e). Напротив, предварительная обработка SKOV-3 клеток с QU действует как антиоксидант, уменьшая образование АФК и повышая уровень Trx/TrxR (рис. 22 а, г) и сигнального пути mTOR/STAT3 (рис. 22 б, д). В клетках SKOV-3/CDDP окислительный стресс также контролировали путем оценки внутриклеточного уровня белков антиоксидантной системы и сигнального пути.

Помимо изменения пролиферации, клеточного цикла, окислительного стресса, клеточного метаболизма, повышенной способности восстанавливать повреждения ДНК и снижения восприимчивости к апоптозу, клетки рака яичников развивают устойчивость к противоопухолевым препаратам посредством других механизмов, включая изменение внутриклеточного уровня и активности сигнальных путей [302]. Кроме уровня генерации АФК, мы также отслеживали изменения в уровне белков, контролирующих развитие окислительного стресса. В этой связи были оценены изменения в маркерных белках, тесно коррелирующих с клеточной чувствительностью к CDDP. Следует отметить, что ранее нами [89, 115] были предоставлены молекулярные доказательства того факта, что антиоксидантные ферменты (SOD-1, SOD-2, Gpx-

1, CAT и HO-1), транскрипционный фактор Nrf2 и сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR значительно активируются в клетках устойчивой сублинии SKOV-3/CDDP по сравнению с чувствительными клетками SKOV-3 и экспрессия генов таких белков связана с толерантностью к CDDP (рис. 8,9). Действие только QU или CUR вызывало заметное снижение экспрессии этих генов (рис. 21, 28 соответственно). Полученные данные убедительно демонстрируют, что прединкубация с QU и CUR потенциально может повысить чувствительность к CDDP в клетках сублинии SKOV-3/CDDP за счет регуляции развития окислительного стресса (генерации АФК) и клеточного апоптоза путем изменения антиоксидантной системы.

Нами был оценен прооксидантный (потенциально терапевтический) эффект прединкубации с QU на антиоксидантную систему. Система Trx/TrxR необходима для поддержания клеточного редокс-зависимого гомеостаза в живых организмах посредством детоксикации АФК; однако гиперэкспрессия этой системы также может способствовать интенсификации процесса онкогенеза, например, за счет усиления опухолевого роста, ангиогенеза и устойчивости к терапии посредством модуляции как экспрессии генов, так и клеточных сигнальных путей, которые приводят к регуляции путей апоптоза в опухолевых клетках [106]. Благодаря тиоловым группам остатков Cys в активном центре Trx участвует в восстановлении окисленных белков-мишеней, в частности, пероксиредоксинов (Prxs) [260], классификация которых включает три подтипа - типичный, атипичный, содержащие 2 остатка Cys, и Prxs с 1 остатком Cys в активном центре [190]. Восстановленные Prx разлагают H₂O₂ до воды и кислорода [190, 260]. В нормальных клетках Prxs оказывают значительное влияние на различные физиологические процессы, включая рост клеток, дифференцировку, апоптоз, клеточный гомеостаз и редокс-зависимый сигналинг. Появление большого количества данных позволяет предположить, что гиперэкспрессия изоформ Prx ответственна за развитие устойчивости к противоопухолевым препаратам и оказывает в этом случае заметное влияние на

опухолевый рост [190]. Так, гиперэкспрессия гена *PRX2* способствует химиорезистентности за счет ингибирования индуцированного цисплатином апоптоза в клетках SNU638 [49]. Высокий уровень экспрессии гена *PRX6* связан с повышением устойчивости к цисплатину за счет усиления стволоподобных свойств клеток рака легких [294].

В нашей работе получены данные, подтверждающие тот факт, что клетки сублинии SKOV-3/CDDP обладают гиперэкспрессией генов изоформ Prx (*Prx1,2,3,5* и *6*) по сравнению с клетками дикого типа SKOV-3 (рис. 7). Экспрессия этих генов значительно снижается в случае инкубации с CUR или QU.

Нормальные клетки демонстрируют низкую экспрессию гена *Nrf2* для поддержания защиты от окислительного стресса [130], тогда как низкий уровень белка *Nrf2* поддерживается с помощью Kelch-подобного ECH-ассоциированного белка 1 (*Keap1*), связанного с системой убиквитинирования и протеасомной деградации [282]. Наблюдаемый высокий уровень *Nrf2* в опухолевых клетках связан с прогрессированием рака, метастазированием, ангиогенезом и развитием лекарственной устойчивости к противоопухолевым препаратам [130, 218], включая CDDP, доксорубин и этопозид [282]. После действия стресса, вызывающего усиление генерации АФК, нарушение регуляции электрофилов и аутофагии, уровень белка *Nrf2* повышается с последующей транслокацией в ядро, где он гетеродимеризуется с белками sMAF и связывается с ARE-элементом в промоторной области генов-мишеней, стимулируя их экспрессию, включая гены выживания, пролиферации и антиоксидантной защиты [218].

Нами показано, что усиление *Nrf2*-опосредованного пути выживания связано с формированием устойчивости клеток сублинии SKOV-3/CDDP к CDDP и приводит к усилению антиоксидантной защиты путем повышения экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *CAT* и *HO-1*). Действие куркумина или QU связано со снижением экспрессии

гена *NFE2L2* (рис. 21, 28), что, в свою очередь, вызывает подавление экспрессии данных антиоксидантных ферментов (рис. 21, 28).

В клетках устойчивой сублинии SKOV-3/CDDP нами обнаружена гиперэкспрессия генов киназ сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, которая снижалась после действия куркумина или QU. Проведенные ранее исследования демонстрируют существование сильной корреляции между гиперэкспрессией генов киназ PI3K/AKT, связанных с лекарственной устойчивостью злокачественного новообразования, и опухолевым ростом [62]. Сигнальный путь PI3K/AKT способствует пролиферации опухоли и подавляет апоптоз, регулируя активность mTOR, GSK-3 β и NF- κ B и запуская XIAP, который подавляет активность каспазы-3 [149].

По сравнению с клетками SKOV-3 клетки сублинии SKOV-3/CDDP демонстрируют значительное повышение уровней белка как цитозольной (TxR1), так и митохондриальной (Tx2) изоформ Tx, которые напрямую связаны с резистентностью к CDDP (рис. 22). Ряд данных свидетельствуют о модуляции активности Tx-зависимой системы природными полифенольными соединениями, которые действуют как её ингибиторы [106]. Ингибирующий эффект QU зависит от многих факторов, включая концентрацию НАДФН(H⁺), время действия и влияние на С-концевую последовательность активного центра -Gly-Cys-Sec-Gly TxR. Ингибирование активности TxR приводит к накоплению окисленной формы Tx в клетках [158]. Как и ожидалось, нами было установлено, что прединкубация с QU эффективно снижает уровни белков тиоредоксин-зависимой системы (Tx1, TxR1 и Tx2) в клетках SKOV-3/CDDP (рис. 22 а, г).

Кроме того, нами обнаружено, что внутриклеточный уровень белка STAT3 и его двух фосфорилированных форм (по Ser⁷²⁷ и Tyr⁷⁰⁵) снижается в клетках сублинии SKOV-3/CDDP при предварительной обработке QU (рис. 5 б,д). Известно, что некоторые ингибиторы TxR1 также блокируют активность транскрипционного фактора STAT3 посредством накопления окисленного

STAT3, что блокирует STAT3-зависимую транскрипцию генов [37, 48] и активирует гибель опухолевых клеток [37]. Благодаря тиоловым группам остатков Cys в активном центре восстановленный Trx катализирует восстановление дисульфидных связей окисленных белков-мишеней [48, 307], в том числе STAT3 [48].

Ранее нами показано, что клетки сублинии SKOV-3/CDDP гиперэкспрессируют ген *mTOR*, экспрессия которого снижается при действии QU [89]. В опубликованной недавно работе установлена корреляция между гиперэкспрессией генов *STAT3* и *mTOR*, которая лежит в основе лекарственной устойчивости и опухолевой прогрессии. Более того, фосфорилирование STAT3 по Ser⁷²⁷ регулируется mTOR [181]. Наши результаты подтверждают эти данные. В частности, нами установлено значительное повышение внутриклеточного уровня как STAT3, так и mTOR в клетках SKOV-3/CDDP по сравнению с SKOV-3, тогда как прединкубация с QU приводит к снижению уровня фосфорилированных изоформ STAT3 по Ser⁷²⁷ и Tyr⁷⁰⁵, а также фосфо-mTOR по Ser²⁴⁴⁸ в резистентных клетках. Данный эффект свидетельствует об инактивации пути mTOR/STAT3, что в итоге приводит к подавлению пролиферации и индукции каспазо-зависимого апоптоза в клетках SKOV-3/CDDP.

Апоптотическая гибель клеток может быть вызвана подавлением сигнального пути mTOR/STAT3, который тесно связан с прогрессией опухоли. Кроме того, индукция ареста клеточного цикла путем повышения фосфорилирования p53 и активация апоптоза после действия QU в ВПЧ-положительных клетках рака шейки матки рассматриваются как один из ключевых механизмов, лежащих в основе подавления пролиферации опухолевых клеток [51].

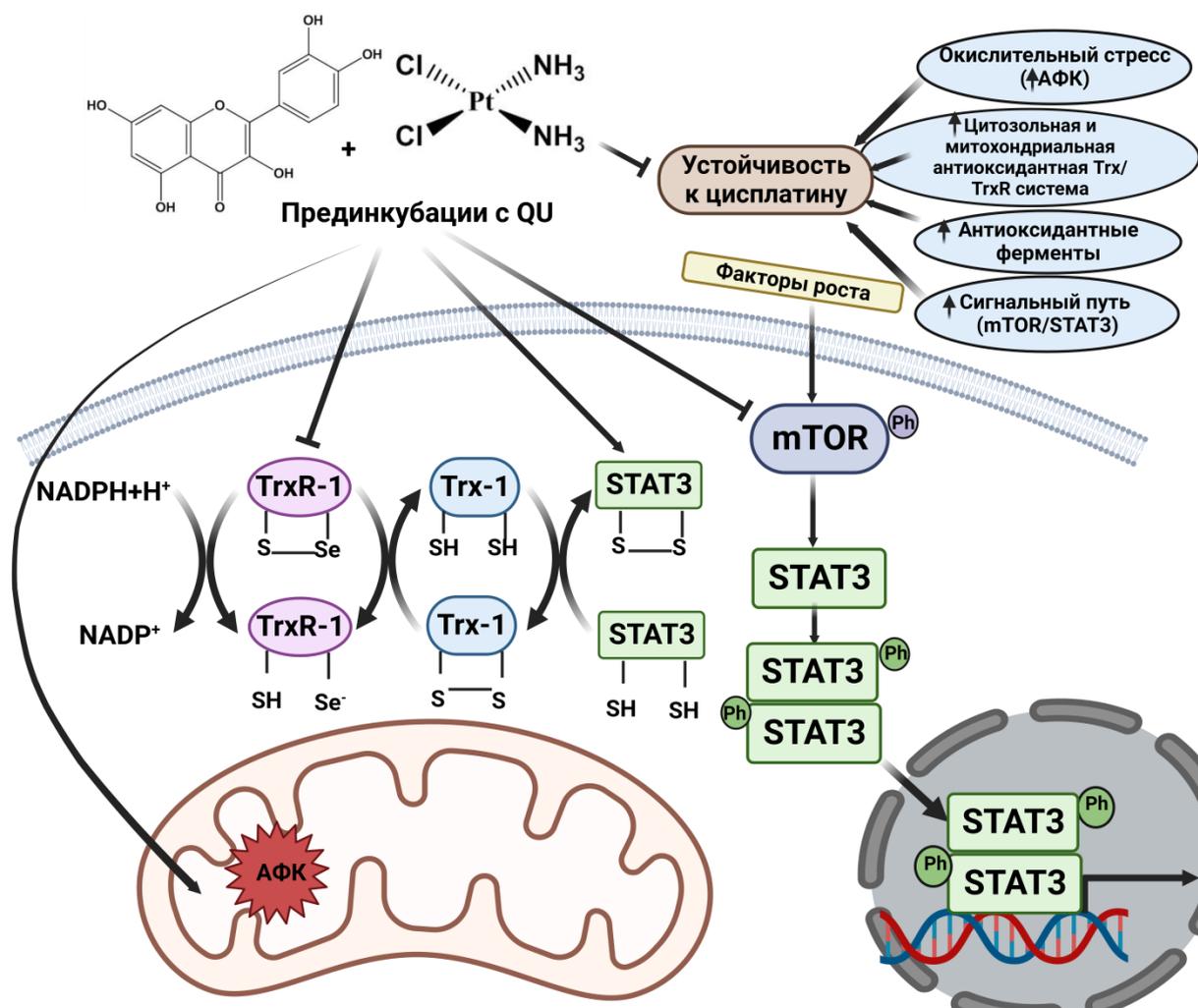


Рис. 29. Предлагаемые антипролиферативные и сенсбилизирующие механизмы прединкубации с QU. Прединкубация клеток с QU влияет на различные мишени, включая антиоксидантную систему Trx/TrxR и сигнальные пути, участвующие в развитии и прогрессии опухоли. Восстановленный Trx, уровень которого поддерживается TrxR, катализирует восстановление дисульфидов в окисленных клеточных белках, включая транскрипционный фактор STAT3. Ингибирование TrxR при прединкубации с QU приводит к накоплению окисленного STAT3 и подавляет STAT3-зависимую транскрипцию генов. Мишенью действия QU также является mTOR. Ингибирование mTOR связано со снижением фосфорилирования STAT3 как по Ser⁷²⁷, так и по Tyr⁷⁰⁵, что приводит к подавлению жизнеспособности и пролиферации резистентных клеток SKOV-3/CDDP.

Полученные нами данные по окрашиванию аннексином V/PI, которое показывает распределение ранних и поздних апоптотических клеток, демонстрирует активацию апоптоза после прединкубации клеток с QU и

последующего действия CDDP (рис. 23 а, б). Результаты нашей работы также позволили установить, что прединкубация с QU индуцирует гибель клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP посредством митохондриально-зависимого пути апоптоза, при котором митохондриальная дисфункция, усиление расщепления

PARP и активация каспаз-9,-7, -3 являются критическими событиями для развития апоптоза (рис. 23 с). Действие QU может вызывать индукцию как некроза, так и апоптотической гибели клеток в различных опухолевых клетках, включая клетки рака полости рта SCC-9 [82] и рака простаты [283]. Нами установлен зависимый от времени прединкубации с QU характер активации апоптоза и гибели опухолевых клеток (рис. 23 а, б). Предлагаемые антипролиферативные и сенсibiliзирующие механизмы прединкубации с QU представлены на рис. 29.

Заключение

Высокий уровень экспрессии генов антиоксидантной защиты характеризует становление устойчивости клеток SKOV-3 к CDDP – соединению с прооксидантной активностью [210]. Рост экспрессии генов *TRX1*, *TRX2*, *TRXR1*, *TRXR2*, контролирующих состояние Тгх-зависимой системы, в резистентных к CDDP опухолевых клетках в значительной степени можно рассматривать как результат редокс-зависимой регуляции, вызываемый прооксидантным действием цисплатина в процессе формирования лекарственной резистентности. На то, что этот эффект является важной составной частью в редокс-зависимых механизмах выживания опухолевых клеток в ответ на действие противоопухолевых препаратов, указывает однонаправленный характер изменения экспрессии генов Тгх-зависимой системы и изоформ Ргх, сопряженная функциональная активность которых регулирует внутриклеточный уровень H_2O_2 , а также совпадение роста экспрессии генов Тгх-зависимой системы со скоординированным повышением экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, активность которого зависит от уровня АФК, и который является ключевым сигнальным путем, определяющим рост, пролиферацию и выживание клеток.

Оценка вклада Тгх-зависимой системы редокс-зависимые процессы лекарственной устойчивости опухолевых клеток продемонстрирована в данной работе с использованием куркумина и кверцетина, оказывающих ингибирующее действие на ТгхR. Действие куркумина и кверцетина вызывает резкое снижение экспрессии генов *TRX1*, *TRX2*, *TRXR1*, *TRXR2*, сопряженное с подавлением экспрессии генов изоформ Ргх и генов ключевых антиоксидантных ферментов. Наблюдаемая депрессия антиоксидантной системы в значительной степени может объясняться снижением экспрессии гена транскрипционного фактора Nrf2, контролирующего экспрессию генов большинства антиоксидантных

ферментов и экспрессия которого может регулироваться Trx-зависимой системой [41, 102]. В свою очередь, вызываемый куркумином и кверцетином сдвиг редокс-статуса, вероятно, может быть причиной снижения экспрессии генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, контролирующего пролиферацию опухолевых клеток. Данные о регулирующем действии АФК на PI3K/Akt/mTOR свидетельствуют в пользу такого предположения [127, 210].

Полученные результаты демонстрируют, что цитотоксическое действие куркумина и кверцетина на резистентные SKOV-3/CDDP клетки связано с подавлением Trx/TrxR системы, играющей важную роль в контроле антиоксидантных механизмов, играющих значительную роль в становлении устойчивости клеток SKOV-3 к CDDP.

Преинкубация с QU оказывает прооксидантный эффект, который усиливает генерацию АФК путем ингибирования антиоксидантной системы Trx/TrxR. Более того, преинкубация клеток SKOV-3/CDDP с QU, ингибируя систему Trx/TrxR, вызывает подавление сигнального пути mTOR/STAT3, что приводит к активации митохондриального апоптотического пути (расщепленные каспазы 9, 7 и 3 и расщепленный PARP). Это направление работы предоставляет дополнительные новые данные о механизме, с помощью которого преинкубация с QU «возвращает» чувствительность резистентных клеток SKOV-3/CDDP к CDDP. Оценка цитотоксичности с помощью МТТ-теста также демонстрирует, что преинкубация с CUR повышает чувствительность резистентных клеток SKOV-3/CDDP к CDDP.

Таким образом, Trx-зависимая система, играющая существенную роль в системе антиоксидантной защиты и в передаче редокс-зависимого сигнала, является важной составной частью в редокс-зависимых механизмах выживания и формирования устойчивости опухолевых клеток к цисплатину.

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 Tlx/TlxR/Prx, ключевых антиоксидантных ферментов и киназ сигнальных путей PI3K/AkT/mTOR.
2. В резистентных клетках действие необратимых ингибиторов TlxR - куркумина и кверцетина, вызывает значительное снижение экспрессии генов ферментов системы Tlx/TlxR/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 Tlx/TlxR, 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 литературы

1. A. C. Rana, Rana, and Bhawna Gulliya. 2019. “Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review.” *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 53 (1): 8–20. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.1.3>.
2. Abbas, Munawar, Farhan Saeed, Faqir Muhammad Anjum, Muhammad Afzaal, Tabussam Tufail, Muhammad Shakeel Bashir, Adnan Ishtiaq, Shahzad Hussain, and Hafiz Ansar Rasul Suleria. 2017. “Natural Polyphenols: An Overview.” *International Journal of Food Properties* 20 (8): 1689–99. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
3. Abdul-Ghani, R, V Serra, B Györfy, K Jürchott, A Solf, M Dietel, and R Schäfer. 2006. “The PI3K Inhibitor LY294002 Blocks Drug Export from Resistant Colon Carcinoma Cells Overexpressing MRP1.” *Oncogene* 25 (12): 1743–52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209201>.
4. Abu-Eid, Rasha, Raed N. Samara, Laurent Ozbun, Maher Y. Abdalla, Jay A. Berzofsky, Kevin M. Friedman, Mikayel Mkrtichyan, and Samir N. Khleif. 2014. “Selective Inhibition of Regulatory T Cells by Targeting the PI3K–Akt Pathway.” *Cancer Immunology Research* 2 (11): 1080–89. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0095>.
5. Aggarwal, Vaishali, Hardeep Tuli, Ayşegül Varol, Falak Thakral, Mukerrem Yerer, Katrin Sak, Mehmet Varol, Aklank Jain, Md. Khan, and Gautam Sethi. 2019. “Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements.” *Biomolecules* 9 (11): 735. <https://doi.org/10.3390/biom9110735>.
6. Al-Kandari, Fadel, Al-Saleh, Khashab, and Al-Maghrebi. 2019. “The Thioredoxin System Is Regulated by the ASK-1/JNK/P38/Survivin Pathway During Germ Cell Apoptosis.” *Molecules* 24 (18): 3333. <https://doi.org/10.3390/molecules24183333>.
7. Amalraj, Augustine, Anitha Pius, Sreerag Gopi, and Sreeraj Gopi. 2017. “Biological Activities of Curcuminoids, Other Biomolecules from Turmeric and

- Their Derivatives – A Review.” *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7 (2): 205–33. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.005>.
8. Amin, A. R. M. Ruhul, Abedul Haque, Mohammad Aminur Rahman, Zhuo Georgia Chen, Fadlo Raja Khuri, and Dong Moon Shin. 2015. “Curcumin Induces Apoptosis of Upper Aerodigestive Tract Cancer Cells by Targeting Multiple Pathways.” Edited by Salvatore V Pizzo. *PLOS ONE* 10 (4): e0124218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124218>.
 9. Anand, Preetha, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Robert A. Newman, and Bharat B. Aggarwal. 2007. “Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises.” *Molecular Pharmaceutics* 4 (6): 807–18. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>.
 10. Anand, Preetha, Sherin G. Thomas, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Chitra Sundaram, Kuzhuvilil B. Harikumar, Bokyoung Sung, Sheeja T. Tharakan, et al. 2008. “Biological Activities of Curcumin and Its Analogues (Congeners) Made by Man and Mother Nature.” *Biochemical Pharmacology* 76 (11): 1590–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.008>.
 11. Anestål, Karin, Stefanie Prast-Nielsen, Narimantas Cenas, and Elias S. J. Arnér. 2008. “Cell Death by SecTRAPs: Thioredoxin Reductase as a Prooxidant Killer of Cells.” Edited by Dong-Yan Jin. *PLoS ONE* 3 (4): e1846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001846>.
 12. Arambula, J. F., R. McCall, K. J. Sidoran, D. Magda, N. A. Mitchell, C. W. Bielawski, V. M. Lynch, J. L. Sessler, and K. Arumugam. 2016. “Targeting Antioxidant Pathways with Ferrocenylated N-Heterocyclic Carbene Supported Gold(I) Complexes in A549 Lung Cancer Cells.” *Chemical Science* 7 (2): 1245–56. <https://doi.org/10.1039/C5SC03519H>.
 13. Arnér, Elias S.J. 2009. “Focus on Mammalian Thioredoxin Reductases — Important Selenoproteins with Versatile Functions.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (6): 495–526. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>.

14. Arnér, Elias S.J., Hajime Nakamura, Tetsuro Sasada, Junji Yodoi, Arne Holmgren, and Giannis Spyrou. 2001. "Analysis of the Inhibition of Mammalian Thioredoxin, Thioredoxin Reductase, and Glutaredoxin by Cis - Diamminedichloroplatinum (II) and Its Major Metabolite, the Glutathione-Platinum Complex." *Free Radical Biology and Medicine* 31 (10): 1170–78. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00698-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00698-0).
15. Arnér, Elias S.J., Liangwei Zhong, and Arne Holmgren. 1999. "Preparation and Assay of Mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase." In *Methods in Enzymology*, 300:226–39. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)00129-9).
16. Avval, Farnaz Zahedi, and Arne Holmgren. 2009. "Molecular Mechanisms of Thioredoxin and Glutaredoxin as Hydrogen Donors for Mammalian S Phase Ribonucleotide Reductase." *Journal of Biological Chemistry* 284 (13): 8233–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809338200>.
17. Azeem, Muhammad, Muhammad Hanif, Khalid Mahmood, Nabeela Ameer, Fazal Rahman Sajid Chughtai, and Usman Abid. 2022. "An Insight into Anticancer, Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetic and Anti-Inflammatory Effects of Quercetin: A Review." *Polymer Bulletin*, January. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8>.
18. Baharuddin, Puteri, Nazilah Satar, Kamal Shaik Fakiruddin, Norashikin Zakaria, Moon Nian Lim, Narazah Mohd Yusoff, Zubaidah Zakaria, and Badrul Hisham Yahaya. 2016. "Curcumin Improves the Efficacy of Cisplatin by Targeting Cancer Stem-like Cells through P21 and Cyclin D1-Mediated Tumour Cell Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines." *Oncology Reports* 35 (1): 13–25. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4371>.
19. Balsera, Monica, and Bob B. Buchanan. 2019. "Evolution of the Thioredoxin System as a Step Enabling Adaptation to Oxidative Stress." *Free Radical Biology & Medicine* 140 (August): 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003>.

20. Batiha, Gaber El-Saber, Amany Magdy Beshbishy, Muhammad Ikram, Zohair S. Mulla, Mohamed E. Abd El-Hack, Ayman E. Taha, Abdelazeem M. Algammal, and Yaser Hosny Ali Elewa. 2020. "The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin." *Foods* 9 (3): 374. <https://doi.org/10.3390/foods9030374>.
21. Belinha, Iracema, Maria Amélia Amorim, Pedro Rodrigues, Victor de Freitas, Pedro Moradas-Ferreira, Nuno Mateus, and Vítor Costa. 2007. "Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6): 2446–51. <https://doi.org/10.1021/jf063302e>.
22. Bellacosa, Alfonso, Joseph R. Testa, Robert Moore, and Lionel Larue. 2004. "A Portrait of AKT Kinases: Human Cancer and Animal Models Depict a Family with Strong Individualities." *Cancer Biology & Therapy* 3 (3): 268–75. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.3.703>.
23. Bellezza, Ilaria, Ileana Giambanco, Alba Minelli, and Rosario Donato. 2018. "Nrf2-Keap1 Signaling in Oxidative and Reductive Stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865 (5): 721–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>.
24. Belotte, Jimmy, Nicole M. Fletcher, Awoniyi O. Awonuga, Mitchell Alexis, Husam M. Abu-Soud, Mohammed G. Saed, Michael P. Diamond, and Ghassan M. Saed. 2014. "The Role of Oxidative Stress in the Development of Cisplatin Resistance in Epithelial Ovarian Cancer." *Reproductive Sciences* 21 (4): 503–8. <https://doi.org/10.1177/1933719113503403>.
25. Benhar, Moran, Iart Luca Shytaj, Jonathan S. Stamler, and Andrea Savarino. 2016. "Dual Targeting of the Thioredoxin and Glutathione Systems in Cancer and HIV." *Journal of Clinical Investigation* 126 (5): 1630–39. <https://doi.org/10.1172/JCI85339>.

26. Bhatia, Maneet, Kelly L. McGrath, Giovanna Di Trapani, Pornpimol Charoentong, Fenil Shah, Mallory M. King, Frank M. Clarke, and Kathryn F. Tonissen. 2016. "The Thioredoxin System in Breast Cancer Cell Invasion and Migration." *Redox Biology* 8 (August): 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.004>.
27. Biaglow, John E., Jerry Donahue, Steve Tuttle, Kathryn Held, Carol Chrestensen, and John Mieyal. 2000. "A Method for Measuring Disulfide Reduction by Cultured Mammalian Cells: Relative Contributions of Glutathione-Dependent and Glutathione-Independent Mechanisms." *Analytical Biochemistry* 281 (1): 77–86. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4533>.
28. Bidian, Cristina, Daniela-Rodica Mitrea, Olivia Gabriela Vasile, Adriana Filip, Adriana Florinela Cătoi, Remus Moldovan, Nicoleta Decea, and Adriana Albu. 2020. "Quercetin and Curcumin Effects in Experimental Pleural Inflammation." *Medicine and Pharmacy Reports*, March. <https://doi.org/10.15386/mpr-1484>.
29. Bjørklund, Geir, Lili Zou, Jun Wang, Christos T. Chasapis, and Massimiliano Peana. 2021. "Thioredoxin Reductase as a Pharmacological Target." *Pharmacological Research* 174 (December): 105854. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105854>.
30. Borkar, Prachitee, Prasan Bhandari, Shraddha Yadav, and Ashwini Prabhu. 2021. "Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer: Classical Outlook and Newer Perspectives." *Biomedical and Pharmacology Journal* 14 (4): 1993–2005. <https://doi.org/10.13005/bpj/2297>.
31. Branco, Vasco, João Canário, Arne Holmgren, and Cristina Carvalho. 2011. "Inhibition of the Thioredoxin System in the Brain and Liver of Zebra-Seabreams Exposed to Waterborne Methylmercury." *Toxicology and Applied Pharmacology* 251 (2): 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.12.005>.
32. Brigelius-Flohé, Regina, and Matilde Maiorino. 2013. "Glutathione Peroxidases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5): 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.

33. Brunet, Anne, Azad Bonni, Michael J Zigmond, Michael Z Lin, Peter Jue, Linda S Hu, Michael J Anderson, Karen C Arden, John Blenis, and Michael E Greenberg. 1999. "Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor." *Cell* 96 (6): 857–68. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4).
34. Buchko, Garry W., Stephen N. Hewitt, Wesley C. Van Voorhis, and Peter J. Myler. 2018. "Solution NMR Structures of Oxidized and Reduced *Ehrlichia Chaffeensis* Thioredoxin: NMR-Invisible Structure Owing to Backbone Dynamics." *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 74 (1): 46–56. <https://doi.org/10.1107/S2053230X1701799X>.
35. Bukowski, Karol, Mateusz Kciuk, and Renata Kontek. 2020. "Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9): 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.
36. Burgering, Boudewijn M. Th., and Paul J. Coffer. 1995. "Protein Kinase B (c-Akt) in Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Signal Transduction." *Nature* 376 (6541): 599–602. <https://doi.org/10.1038/376599a0>.
37. Busker, S., W. Qian, M. Haraldsson, B. Espinosa, L. Johansson, S. Attarha, I. Kolosenko, et al. 2020. "Irreversible TrxR1 Inhibitors Block STAT3 Activity and Induce Cancer Cell Death." *Science Advances* 6 (12): eaax7945. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7945>.
38. Campbell, Robert A., Poornima Bhat-Nakshatri, Nikhil M. Patel, Demetra Constantinidou, Simak Ali, and Harikrishna Nakshatri. 2001. "Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-Mediated Activation of Estrogen Receptor α ." *Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 9817–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010840200>.
39. Carver, Brett S., Caren Chapinski, John Wongvipat, Haley Hieronymus, Yu Chen, Sarat Chandralapaty, Vivek K. Arora, et al. 2011. "Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient

- Prostate Cancer.” *Cancer Cell* 19 (5): 575–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.008>.
40. Catanzaro, Daniela, Eugenio Ragazzi, Caterina Vianello, Laura Caparrotta, and Monica Montopoli. 2015. “Effect of Quercetin on Cell Cycle and Cyclin Expression in Ovarian Carcinoma and Osteosarcoma Cell Lines.” *Natural Product Communications* 10 (8): 1365–68.
41. Cebula, Marcus, Edward E. Schmidt, and Elias S.J. Arnér. 2015. “TrxR1 as a Potent Regulator of the Nrf2-Keap1 Response System.” *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (10): 823–53. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6378>.
42. Cháirez-Ramírez, Manuel Humberto, Karen Griselda de la Cruz-López, and Alejandro García-Carrancá. 2021. “Polyphenols as Antitumor Agents Targeting Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways.” *Frontiers in Pharmacology* 12 (October): 710304.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710304>.
43. Chan, Marion M., Dunne Fong, Kenneth J. Soprano, William F. Holmes, and Harry Heverling. 2003. “Inhibition of Growth and Sensitization to Cisplatin-Mediated Killing of Ovarian Cancer Cells by Polyphenolic Chemopreventive Agents.” *Journal of Cellular Physiology* 194 (1): 63–70.
<https://doi.org/10.1002/jcp.10186>.
44. Chen, Chaofei, Kang Wang, Haifeng Zhang, Huanjiao Jenny Zhou, Yuxin Chen, and Wang Min. 2019. “A Unique SUMO-Interacting Motif of Trx2 Is Critical for Its Mitochondrial Presequence Processing and Anti-Oxidant Activity.” *Frontiers in Physiology* 10 (August): 1089.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01089>.
45. Chen, Dongshao, Xiaoting Lin, Cheng Zhang, Zhentao Liu, Zuhua Chen, Zhongwu Li, Jingyuan Wang, et al. 2018. “Dual PI3K/mTOR Inhibitor BEZ235 as a Promising Therapeutic Strategy against Paclitaxel-Resistant Gastric Cancer via Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway.” *Cell Death & Disease* 9 (2): 123.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0132-2>.

- 46.Cheng, Ping, Huan Liu, Yinchuan Li, Peiling Pi, Yu Jiang, Shaozhen Zang, Xiaorong Li, et al. 2020. “Inhibition of Thioredoxin Reductase 1 Correlates with Platinum-Based Chemotherapeutic Induced Tissue Injury.” *Biochemical Pharmacology* 175 (May): 113873. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113873>.
- 47.Choi, Byeong Hyeok, Chang Gun Kim, Young-Seuk Bae, Yoongho Lim, Young Han Lee, and Soon Young Shin. 2008. “p21Waf1/Cip1 Expression by Curcumin in U-87MG Human Glioma Cells: Role of Early Growth Response-1 Expression.” *Cancer Research* 68 (5): 1369–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5222>.
- 48.Chun, Kyung-Soo, Jeong-Hoon Jang, and Do-Hee Kim. 2020. “Perspectives Regarding the Intersections between STAT3 and Oxidative Metabolism in Cancer.” *Cells* 9 (10): 2202. <https://doi.org/10.3390/cells9102202>.
- 49.Chung, Y. M., Y. D. Yoo, J. K. Park, Y. T. Kim, and H. J. Kim. 2001. “Increased Expression of Peroxiredoxin II Confers Resistance to Cisplatin.” *Anticancer Research* 21 (2A): 1129–33.
- 50.Cione, Erika, Chiara La Torre, Roberto Cannataro, Maria Cristina Caroleo, Pierluigi Plastina, and Luca Gallelli. 2019. “Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation.” *Molecules* 25 (1): 63. <https://doi.org/10.3390/molecules25010063>.
- 51.Clemente-Soto, Aldo, Enrique Salas-Vidal, Cesar Milan-Pacheco, Jessica Sánchez-Carranza, Oscar Peralta-Zaragoza, and Leticia González-Maya. 2019a. “Quercetin Induces G2 Phase Arrest and Apoptosis with the Activation of P53 in an E6 Expression-independent Manner in HPV-positive Human Cervical Cancer-derived Cells.” *Molecular Medicine Reports*, January. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9850>.

52. Collet, Jean-Francois, and Joris Messens. 2010. "Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins." *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (8): 1205–16. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>.
53. Cormio, G., C. Rossi, A. Cazzolla, L. Resta, G. Loverro, P. Greco, and L. Selvaggi. 2003. "Distant Metastases in Ovarian Carcinoma." *International Journal of Gynecological Cancer* 13 (2): 125–29. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2003.13054.x>.
54. Cortez, Alexander J., Patrycja Tudrej, Katarzyna A. Kujawa, and Katarzyna M. Lisowska. 2018. "Advances in Ovarian Cancer Therapy." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 81 (1): 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>.
55. Cotugno, Roberta, Dario Gallotta, Fabrizio Dal Piaz, Ivana Apicella, Sandro De Falco, Sergio Rosselli, Maurizio Bruno, and Maria Antonietta Belisario. 2014. "Powerful Tumor Cell Growth-Inhibiting Activity of a Synthetic Derivative of Atractyligenin: Involvement of PI3K/Akt Pathway and Thioredoxin System." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (3): 1135–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.023>.
56. Cox, Andrew G., Christine C. Winterbourn, and Mark B. Hampton. 2010. "Mitochondrial Peroxiredoxin Involvement in Antioxidant Defence and Redox Signalling." *Biochemical Journal* 425 (2): 313–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>.
57. Currier, Rachel B., Kathrin Ulrich, Alejandro E. Leroux, Natalie Dirdjaja, Matías Deambrosi, Mariana Bonilla, Yasar Luqman Ahmed, et al. 2019. "An Essential Thioredoxin-Type Protein of Trypanosoma Brucei Acts as Redox-Regulated Mitochondrial Chaperone." Edited by Michael P. Barrett. *PLOS Pathogens* 15 (9): e1008065. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008065>.
58. Datta, Sandeep Robert, Henryk Dudek, Xu Tao, Shane Masters, Haiyan Fu, Yukiko Gotoh, and Michael E Greenberg. 1997. "Akt Phosphorylation of BAD

- Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery.” *Cell* 91 (2): 231–41. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5).
59. Deepika, and Pawan Kumar Maurya. 2022. “Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases.” *Molecules* 27 (8): 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>.
60. Dharmaraja, Allimuthu T. 2017. “Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria.” *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (8): 3221–40. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01243>.
61. Dhima, Irida Th., Dimitrios Peschos, Yannis V. Simos, Maria I. Gkiouli, Maria E. Palatianou, Vasilios N. Ragos, Vasiliki Kalfakakou, Angelos M. Evangelou, and Spyridon Ch. Karkabounas. 2018. “Modulation of Cisplatin Cytotoxic Activity against Leiomyosarcoma Cells by Epigallocatechin-3-Gallate.” *Natural Product Research* 32 (11): 1337–42. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1343318>.
62. Dong, Chao, Jiao Wu, Yin Chen, Jianyun Nie, and Ceshi Chen. 2021. “Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer.” *Frontiers in Pharmacology* 12 (March): 628690. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>.
63. Du, Hui, Sunghan Kim, Yoon-Sun Hur, Myung-Sok Lee, Suk-Ha Lee, and Choong-Ill Cheon. 2015. “A Cytosolic Thioredoxin Acts as a Molecular Chaperone for Peroxisome Matrix Proteins as Well as Antioxidant in Peroxisome.” *Molecules and Cells* 38 (2): 187–94. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2255>.
64. Du, Yatao, Huihui Zhang, Jun Lu, and Arne Holmgren. 2012. “Glutathione and Glutaredoxin Act as a Backup of Human Thioredoxin Reductase 1 to Reduce Thioredoxin 1 Preventing Cell Death by Aurothioglucose.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (45): 38210–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.392225>.

65. Du, Yatao, Huihui Zhang, Xu Zhang, Jun Lu, and Arne Holmgren. 2013. "Thioredoxin 1 Is Inactivated Due to Oxidation Induced by Peroxiredoxin under Oxidative Stress and Reactivated by the Glutaredoxin System." *Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32241–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495150>.
66. Duan, Dongzhu, Baoxin Zhang, Juan Yao, Yaping Liu, Jinyu Sun, Chunpo Ge, Shoujiao Peng, and Jianguo Fang. 2014. "Gambogic Acid Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells by Targeting Cytosolic Thioredoxin Reductase." *Free Radical Biology and Medicine* 69 (April): 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.027>.
67. Er, Ekrem Emrah, Michelle C. Mendoza, Ashley M. Mackey, Lucia E. Rameh, and John Blenis. 2013. "AKT Facilitates EGFR Trafficking and Degradation by Phosphorylating and Activating PIKfyve." *Science Signaling* 6 (279). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004015>.
68. Fang, Jianguo, Jun Lu, and Arne Holmgren. 2005. "Thioredoxin Reductase Is Irreversibly Modified by Curcumin." *Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 25284–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414645200>.
69. Fang, Xianjun, Shuang Xing Yu, Yiling Lu, Robert C. Bast, James R. Woodgett, and Gordon B. Mills. 2000. "Phosphorylation and Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 by Protein Kinase A." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (22): 11960–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.220413597>.
70. Fisher, Aron B., Jose P. Vasquez-Medina, Chandra Dodia, Elena M. Sorokina, Jian-Qin Tao, and Sheldon I. Feinstein. 2018. "Peroxiredoxin 6 Phospholipid Hydroperoxidase Activity in the Repair of Peroxidized Cell Membranes." *Redox Biology* 14 (April): 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.008>.
71. Foloppe, Nicolas, Johan Sagemark, Kerstin Nordstrand, Kurt D. Berndt, and Lennart Nilsson. 2001. "Structure, Dynamics and Electrostatics of the Active Site of Glutaredoxin 3 from Escherichia Coli: Comparison with Functionally

- Related Proteins.” *Journal of Molecular Biology* 310 (2): 449–70. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4767>.
- 72.Fruman, David A., and Christian Rommel. 2014. “PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities.” *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (2): 140–56. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>.
- 73.Fukai, Tohru, and Masuko Ushio-Fukai. 2011. “Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases.” *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (6): 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.
- 74.Gandin, Valentina, and Aristi Fernandes. 2015. “Metal- and Semimetal-Containing Inhibitors of Thioredoxin Reductase as Anticancer Agents.” *Molecules* 20 (7): 12732–56. <https://doi.org/10.3390/molecules200712732>.
- 75.Gasdaska, Pamela Y., John R. Gasdaska, Shawn Cochran, and Garth Powis. 1995. “Cloning and Sequencing of a Human Thioredoxin Reductase.” *FEBS Letters* 373 (1): 5–9. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01003-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01003-W).
- 76.Ghimire, Kedar, Helene M. Altmann, Adam C. Straub, and Jeffrey S. Isenberg. 2017. “Nitric Oxide: What’s New to NO?” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 312 (3): C254–62. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>.
- 77.Gökçe Kütük, Sinem, Gökçen Gökçe, Mustafa Kütük, Hacer Esra Gürses Cila, and Mustafa Nazıroğlu. 2019. “Curcumin Enhances Cisplatin-Induced Human Laryngeal Squamous Cancer Cell Death through Activation of TRPM2 Channel and Mitochondrial Oxidative Stress.” *Scientific Reports* 9 (1): 17784. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54284-x>.
- 78.González, Daniela, Pamela Álamos, Matías Rivero, Omar Orellana, Javiera Norambuena, Renato Chávez, and Gloria Levicán. 2020. “Deciphering the Role of Multiple Thioredoxin Fold Proteins of *Leptospirillum* Sp. in Oxidative Stress Tolerance.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5): 1880. <https://doi.org/10.3390/ijms21051880>.
- 79.Guerrero-Zotano, Angel, Ingrid A. Mayer, and Carlos L. Arteaga. 2016. “PI3K/AKT/mTOR: Role in Breast Cancer Progression, Drug Resistance, and

- Treatment.” *Cancer and Metastasis Reviews* 35 (4): 515–24. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9637-x>.
80. Guo, Xinli, Zhou Fang, Min Zhang, Deyu Yang, Shuyue Wang, and Kehai Liu. 2020. “A Co-Delivery System of Curcumin and P53 for Enhancing the Sensitivity of Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells to Cisplatin.” *Molecules* 25 (11): 2621. <https://doi.org/10.3390/molecules25112621>.
81. Haendeler, Judith, Jörg Hoffmann, Verena Tischler, Bradford C. Berk, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. 2002. “Redox Regulatory and Anti-Apoptotic Functions of Thioredoxin Depend on S-Nitrosylation at Cysteine 69.” *Nature Cell Biology* 4 (10): 743–49. <https://doi.org/10.1038/ncb851>.
82. Haghiac, Maricela, and Thomas Walle. 2005. “Quercetin Induces Necrosis and Apoptosis in SCC-9 Oral Cancer Cells.” *Nutrition and Cancer* 53 (2): 220–31. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5302_11.
83. Hamed, Ahmed R., Nahla S. Abdel-Azim, Khaled A. Shams, and Faiza M. Hammouda. 2019. “Targeting Multidrug Resistance in Cancer by Natural Chemosensitizers.” *Bulletin of the National Research Centre* 43 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0043-8>.
84. Han, L.Q., Z. Zhou, Y. Ma, F. Batistel, J.S. Osorio, and J.J. Loor. 2018. “Phosphorylation of Nuclear Factor Erythroid 2-like 2 (NFE2L2) in Mammary Tissue of Holstein Cows during the Periparturient Period Is Associated with mRNA Abundance of Antioxidant Gene Networks.” *Journal of Dairy Science* 101 (7): 6511–22. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14257>.
85. Hanschmann, Eva-Maria, José Rodrigo Godoy, Carsten Berndt, Christoph Hudemann, and Christopher Horst Lillig. 2013. “Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: From Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling.” *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (13): 1539–1605. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>.
86. Hanschmann, Eva-Maria, Maria Elisabet Lönn, Lena Dorothee Schütte, Maria Funke, José R. Godoy, Susanne Eitner, Christoph Hudemann, and Christopher

- Horst Lillig. 2010. “Both Thioredoxin 2 and Glutaredoxin 2 Contribute to the Reduction of the Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin Prx3.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40699–705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185827>.
87. Harper, Matthew T. 2019. “Auranofin, a Thioredoxin Reductase Inhibitor, Causes Platelet Death through Calcium Overload.” *Platelets* 30 (1): 98–104. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1378809>.
88. Harrington, Laura S., Greg M. Findlay, Alex Gray, Tatiana Tolkacheva, Simon Wigfield, Heike Rebholz, Jill Barnett, et al. 2004. “The TSC1-2 Tumor Suppressor Controls Insulin–PI3K Signaling via Regulation of IRS Proteins.” *Journal of Cell Biology* 166 (2): 213–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403069>.
89. Hasan, A. A. Sh., E. V. Kalinina, V. V. Tatarskiy, Yu. L. Volodina, A. S. Petrova, M. D. Novichkova, D. D. Zhdanov, and A. A. Shtil. 2022. “Suppression of the Antioxidant System and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Cisplatin-Resistant Cancer Cells by Quercetin.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 173 (6): 760–64. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05626-9>.
90. Hasan, Aseel Ali, Victor Tatarskiy, and Elena Kalinina. 2022. “Synthetic Pathways and the Therapeutic Potential of Quercetin and Curcumin.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (22): 14413. <https://doi.org/10.3390/ijms232214413>.
91. Hasanovic, Anida, and Isabelle Mus-Veteau. 2018. “Targeting the Multidrug Transporter Ptch1 Potentiates Chemotherapy Efficiency.” *Cells* 7 (8): 107. <https://doi.org/10.3390/cells7080107>.
92. Hayes, John D., Albena T. Dinkova-Kostova, and Kenneth D. Tew. 2020. “Oxidative Stress in Cancer.” *Cancer Cell* 38 (2): 167–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.

93. He, Jie, Dongdong Li, Kun Xiong, Yongjie Ge, Hongwei Jin, Guozhou Zhang, Mengshi Hong, Yongliang Tian, Jin Yin, and Huihui Zeng. 2012. "Inhibition of Thioredoxin Reductase by a Novel Series of Bis-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-Ones: Organoselenium Compounds for Cancer Therapy." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (12): 3816–27. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.033>.
94. Hennessy, Bryan T., Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu, and Gordon B. Mills. 2005. "Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (12): 988–1004. <https://doi.org/10.1038/nrd1902>.
95. Hollman, Peter C.H., Michel N.C.P. Bijsman, Yvonne van Gameren, Else P.J. Cnossen, Jeanne H.M. de Vries, and Martijn B. Katan. 1999. "The Sugar Moiety Is a Major Determinant of the Absorption of Dietary Flavonoid Glycosides in Man." *Free Radical Research* 31 (6): 569–73. <https://doi.org/10.1080/10715769900301141>.
96. Hsu, Peggy P., Seong A. Kang, Jonathan Rameseder, Yi Zhang, Kathleen A. Ottina, Daniel Lim, Timothy R. Peterson, et al. 2011. "The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling." *Science* 332 (6035): 1317–22. <https://doi.org/10.1126/science.1199498>.
97. Hu, Jianghua, and Yibo Yu. 2018. "The Function of Thioredoxin-Binding Protein-2 (TBP-2) in Different Diseases." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/4582130>.
98. Hu, Shan, Yingchun Xu, Liwei Meng, Liming Huang, and He Sun. 2018. "Curcumin Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Breast Cancer Cells." *Experimental and Therapeutic Medicine*, June. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6345>.
99. Huang, Mou-Tuan. 1997. "Antioxidant and Antitumorigenic Properties of Curcumin." In *Food Factors for Cancer Prevention*, edited by Hajime

- Ohigashi, Toshihiko Osawa, Junji Terao, Shaw Watanabe, and Toshikazu Yoshikawa, 249–52. Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67017-9_50.
100. Hwang-Bo, Hyun, Jin-Woo Jeong, Min Ho Han, Cheol Park, Su-Hyun Hong, Gi-Young Kim, Sung-Kwon Moon, et al. 2017. “Auranofin, an Inhibitor of Thioredoxin Reductase, Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Hep3B Cells by Generation of Reactive Oxygen Species.” *General Physiology and Biophysics* 36 (02): 117–28. https://doi.org/10.4149/gpb_2016043.
101. Jacobsen, Kirstine, Jordi Bertran-Alamillo, Miguel Angel Molina, Cristina Teixidó, Niki Karachaliou, Martin Haar Pedersen, Josep Castellví, et al. 2017. “Convergent Akt Activation Drives Acquired EGFR Inhibitor Resistance in Lung Cancer.” *Nature Communications* 8 (1): 410. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00450-6>.
102. Jaganjac, Morana, Lidija Milkovic, Suzana Borovic Sunjic, and Neven Zarkovic. 2020. “The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies.” *Antioxidants* 9 (11): 1151. <https://doi.org/10.3390/antiox9111151>.
103. Jakobušić Brala, Cvijeta, Ana Karković Marković, Azra Kugić, Jelena Torić, and Monika Barbarić. 2023. “Combination Chemotherapy with Selected Polyphenols in Preclinical and Clinical Studies—An Update Overview.” *Molecules* 28 (9): 3746. <https://doi.org/10.3390/molecules28093746>.
104. Jakubczyk, Karolina, Aleksandra Drużga, Janda Katarzyna, and Karolina Skonieczna-Żydecka. 2020. “Antioxidant Potential of Curcumin—A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials.” *Antioxidants* 9 (11): 1092. <https://doi.org/10.3390/antiox9111092>.
105. Jan, Sumira, and Nazia Abbas. 2018. “Chemistry of Himalayan Phytochemicals.” In *Himalayan Phytochemicals*, 121–66. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102227-6.00004-8>.

106. Jastrzab, Anna, and Elzbieta Skrzydlewska. 2021a. "Thioredoxin-Dependent System. Application of Inhibitors." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36 (1): 362–71. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1867121>.
107. Jia, Jin-Jing, Wen-Shuo Geng, Zhan-Qi Wang, Lei Chen, and Xian-Si Zeng. 2019. "The Role of Thioredoxin System in Cancer: Strategy for Cancer Therapy." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 84 (3): 453–70. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03869-4>.
108. Jiang, Yao, Yanqiong Zhang, Janet Y. Leung, Cheng Fan, Konstantin I. Popov, Siyuan Su, Jiayi Qian, et al. 2019. "MERTK Mediated Novel Site Akt Phosphorylation Alleviates SAV1 Suppression." *Nature Communications* 10 (1): 1515. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09233-7>.
109. Jin, Si, Fan Zhou, Foad Katirai, and Pin-Lan Li. 2011. "Lipid Raft Redox Signaling: Molecular Mechanisms in Health and Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (4): 1043–83. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3619>.
110. Jomová, Klaudia, Lenka Hudecova, Peter Lauro, Miriama Simunkova, Saleh H. Alwasel, Ibrahim M. Alhazza, and Marian Valko. 2019. "A Switch between Antioxidant and Prooxidant Properties of the Phenolic Compounds Myricetin, Morin, 3',4'-Dihydroxyflavone, Taxifolin and 4-Hydroxy-Coumarin in the Presence of Copper(II) Ions: A Spectroscopic, Absorption Titration and DNA Damage Study." *Molecules* 24 (23): 4335. <https://doi.org/10.3390/molecules24234335>.
111. Joo, Min Sung, Won Dong Kim, Ki Young Lee, Ji Hyun Kim, Ja Hyun Koo, and Sang Geon Kim. 2016. "AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550." *Molecular and Cellular Biology* 36 (14): 1931–42. <https://doi.org/10.1128/MCB.00118-16>.
112. Juric, Dejan, Pau Castel, Malachi Griffith, Obi L. Griffith, Helen H. Won, Haley Ellis, Saya H. Ebbesen, et al. 2015. "Convergent Loss of PTEN Leads to

- Clinical Resistance to a PI(3)K α Inhibitor.” *Nature* 518 (7538): 240–44. <https://doi.org/10.1038/nature13948>.
113. Kalinina, E. V., N. N. Chernov, A. N. Saprin, Ya. N. Kotova, Yu. A. Gavrilova, N. S. Chermnykh, and N. P. Shcherbak. 2007. “Expression of Genes for Thioredoxin 1 and Thioredoxin 2 in Multidrug Resistance Ovarian Carcinoma Cells SKVLB.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 144 (3): 301–3. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0316-3>.
114. Kalinina, E. V., N. N. Chernov, A. N. Saprin, Ya. N. Kotova, V. I. Remizov, and N. P. Shcherbak. 2007. “Expression of Genes for Redox-Dependent Glutathione S-Transferase Isoforms GSTP1-1 and GSTA4-4 in Tumor Cell during the Development Doxorubicin Resistance.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 143 (3): 328–30. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0102-2>.
115. Kalinina, E. V., A. A. Sh. Hasan, V. V. Tatarskiy, Yu. L. Volodina, A. S. Petrova, M. D. Novichkova, D. D. Zhdanov, N. K. Nurmuradov, N. N. Chernov, and A. A. Shtil. 2022. “Suppression of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Antioxidant System and Reversal of Cancer Cells Resistance to Cisplatin under the Effect of Curcumin.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 173 (3): 371–75. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05551-x>.
116. Karar, Jayashree, and Amit Maity. 2011. “PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>.
117. Karatkevich, Darya, Haibin Deng, Yanyun Gao, Emilio Flint, Ren-Wang Peng, Ralph Alexander Schmid, Patrick Dorn, and Thomas Michael Marti. 2022. “Schedule-Dependent Treatment Increases Chemotherapy Efficacy in Malignant Pleural Mesothelioma.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (19): 11949. <https://doi.org/10.3390/ijms231911949>.
118. Kawahara, N., T. Tanaka, A. Yokomizo, H. Nanri, M. Ono, M. Wada, K. Kohno, K. Takenaka, K. Sugimachi, and M. Kuwano. 1996. “Enhanced

- Coexpression of Thioredoxin and High Mobility Group Protein 1 Genes in Human Hepatocellular Carcinoma and the Possible Association with Decreased Sensitivity to Cisplatin.” *Cancer Research* 56 (23): 5330–33.
119. Kekulandara, Dilini N., Shima Nagi, Hyosuk Seo, Christine S. Chow, and Young-Hoon Ahn. 2018. “Redox-Inactive Peptide Disrupting Trx1–Ask1 Interaction for Selective Activation of Stress Signaling.” *Biochemistry* 57 (5): 772–80. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01083>.
120. Kern, Renée, Abderrahim Malki, Arne Holmgren, and Gilbert Richarme. 2003. “Chaperone Properties of Escherichia Coli Thioredoxin and Thioredoxin Reductase.” *Biochemical Journal* 371 (3): 965–72. <https://doi.org/10.1042/bj20030093>.
121. Khan, Haroon, Marcella Reale, Hammad Ullah, Antoni Sureda, Silvia Tejada, Ying Wang, Zhang-Jin Zhang, and Jianbo Xiao. 2020. “Anti-Cancer Effects of Polyphenols via Targeting P53 Signaling Pathway: Updates and Future Directions.” *Biotechnology Advances* 38 (January): 107385. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.007>.
122. Kim, Ki Cheon, Kyoung Ah Kang, Rui Zhang, Mei Jing Piao, Gi Young Kim, Mi Young Kang, Su Jae Lee, Nam Ho Lee, Young-Joon Surh, and Jin Won Hyun. 2010. “Up-Regulation of Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression by Eckol, a Phlorotannin Compound, through Activation of Erk and PI3K/Akt.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.009>.
123. Kim, Min-Kyu, Lei Zhao, Soyoung Jeong, Jing Zhang, Jong-Hyun Jung, Ho Seong Seo, Jong-il Choi, and Sangyong Lim. 2021. “Structural and Biochemical Characterization of Thioredoxin-2 from *Deinococcus Radiodurans*.” *Antioxidants* 10 (11): 1843. <https://doi.org/10.3390/antiox10111843>.

124. Kim, Yosup, and Ho Hee Jang. 2019. "Role of Cytosolic 2-Cys Prx1 and Prx2 in Redox Signaling." *Antioxidants* 8 (6): 169. <https://doi.org/10.3390/antiox8060169>.
125. Kobayashi, Hiroshi, Shogo Imanaka, and Hiroshi Shigetomi. 2022. "Revisiting Therapeutic Strategies for Ovarian Cancer by Focusing on Redox Homeostasis (Review)." *Oncology Letters* 23 (3): 80. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13200>.
126. Kondo, Norihiko, Yasuyuki Ishii, Yong-Won Kwon, Masaki Tanito, Junko Sakakura-Nishiyama, Michika Mochizuki, Michiyuki Maeda, et al. 2007. "Lipid Raft-Mediated Uptake of Cysteine-Modified Thioredoxin-1: Apoptosis Enhancement by Inhibiting the Endogenous Thioredoxin-1." *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (9): 1439–48. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1665>.
127. Koundouros, Nikos, and George Poulgiannis. 2018. "Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer." *Frontiers in Oncology* 8 (May): 160. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00160>.
128. Kouwen, Thijs R.H.M., Juni Andréll, Rianne Schrijver, Jean-Yves F. Dubois, Megan J. Maher, So Iwata, Elisabeth P. Carpenter, and Jan Maarten van Dijl. 2008. "Thioredoxin A Active-Site Mutants Form Mixed Disulfide Dimers That Resemble Enzyme-Substrate Reaction Intermediates." *Journal of Molecular Biology* 379 (3): 520–34. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.077>.
129. Kulkarni, Ashish, Siva Kumar Natarajan, Vineethkrishna Chandrasekar, Prithvi Raj Pandey, and Shiladitya Sengupta. 2016. "Combining Immune Checkpoint Inhibitors and Kinase-Inhibiting Supramolecular Therapeutics for Enhanced Anticancer Efficacy." *ACS Nano* 10 (10): 9227–42. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b01600>.
130. Kumar, Hitesh, Rachna M. Kumar, Devanjali Bhattacharjee, Preethi Somanna, and Vikas Jain. 2022. "Role of Nrf2 Signaling Cascade in Breast Cancer: Strategies and Treatment." *Frontiers in Pharmacology* 13 (April): 720076. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.720076>.

131. Kumar, Shashank, and Abhay K. Pandey. 2013a. "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview." *The Scientific World Journal* 2013: 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
132. Kumari, Seema, Anil Kumar Badana, Murali Mohan G, Shailender G, and RamaRao Malla. 2018. "Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival." *Biomarker Insights* 13 (January): 117727191875539. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>.
133. Kurutas, Ergul Belge. 2015. "The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State." *Nutrition Journal* 15 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.
134. Kushwaha, Prem Prakash, Sunita Kumari Prajapati, Seshu Vardhan Pothabathula, Atul Kumar Singh, Mohd Shuaib, Karnika Joshi, and Shashank Kumar. 2020. "Prenylated Flavonoids as a Promising Drug Discovery Candidate." In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, 347–55. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817890-4.00023-8>.
135. Lakhanpal, P, and D K Rai. 2007. "Quercetin: A Versatile Flavonoid." *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL* 2 (2). <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>.
136. Lastwika, Kristin J., Willie Wilson, Qing Kay Li, Jeffrey Norris, Haiying Xu, Sharon R. Ghazarian, Hiroshi Kitagawa, et al. 2016. "Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT–mTOR Pathway in Non–Small Cell Lung Cancer." *Cancer Research* 76 (2): 227–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3362>.
137. Lazarevic, Vanja, Laurie H. Glimcher, and Graham M. Lord. 2013. "T-Bet: A Bridge between Innate and Adaptive Immunity." *Nature Reviews Immunology* 13 (11): 777–89. <https://doi.org/10.1038/nri3536>.
138. Lee, Samuel, Soo Min Kim, and Richard T. Lee. 2013. "Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional

- Significance.” *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (10): 1165–1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>.
139. León-González, Antonio J., Cyril Auger, and Valérie B. Schini-Kerth. 2015. “Pro-Oxidant Activity of Polyphenols and Its Implication on Cancer Chemoprevention and Chemotherapy.” *Biochemical Pharmacology* 98 (3): 371–80. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>.
140. Leu, Chuen-Miin, Fen-Hwa Wong, Chungming Chang, Shiu-Feng Huang, and Cheng-po Hu. 2003. “Interleukin-6 Acts as an Antiapoptotic Factor in Human Esophageal Carcinoma Cells through the Activation of Both STAT3 and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways.” *Oncogene* 22 (49): 7809–18. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207084>.
141. Léveillard, Thierry, and Najate Aït-Ali. 2017. “Cell Signaling with Extracellular Thioredoxin and Thioredoxin-Like Proteins: Insight into Their Mechanisms of Action.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/8475125>.
142. Li, Qiongyu, Zijun Lai, Zhaokun Yan, Jun Peng, Yiyi Jin, Lihui Wei, and Jiumao Lin. 2017. “Hedyotis $\frac{1}{2}$ diffusa Willd Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of 5-FU Resistant Colorectal Cancer Cells by Regulating the PI3K/AKT Signaling Pathway.” *Molecular Medicine Reports*, October. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7903>.
143. Li, Yao, Jiaying Yao, Chunyan Han, Jiaxin Yang, Maria Chaudhry, Shengnan Wang, Hongnan Liu, and Yulong Yin. 2016. “Quercetin, Inflammation and Immunity.” *Nutrients* 8 (3): 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>.
144. Lillig, Christopher Horst, and Arne Holmgren. 2007. “Thioredoxin and Related Molecules—From Biology to Health and Disease.” *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (1): 25–47. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.25>.

145. Lim, Wendell, Bruce Mayer, and T. Pawson. 2015. *Cell Signaling: Principles and Mechanisms*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
146. Lin, Jiumao, Jianyu Feng, Hong Yang, Zhaokun Yan, Qiongyu Li, Lihui Wei, Zijun Lai, Yiyi Jin, and Jun Peng. 2017. “Scutellaria Barbata D. Don Inhibits 5-Fluorouracil Resistance in Colorectal Cancer by Regulating PI3K/AKT Pathway.” *Oncology Reports* 38 (4): 2293–2300. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5892>.
147. Lincoln, David T., Eman M. Ali Emadi, Kathryn F. Tonissen, and Frank M. Clarke. 2003. “The Thioredoxin-Thioredoxin Reductase System: Over-Expression in Human Cancer.” *Anticancer Research* 23 (3B): 2425–33.
148. Lismont, Celien, Marcus Nordgren, Paul P. Van Veldhoven, and Marc Franssen. 2015. “Redox Interplay between Mitochondria and Peroxisomes.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (May). <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00035>.
149. Liu, Rui, Youwen Chen, Guangzhi Liu, Chenxi Li, Yurong Song, Zhiwen Cao, Wen Li, Jinghong Hu, Cheng Lu, and Yuanyan Liu. 2020a. “PI3K/AKT Pathway as a Key Link Modulates the Multidrug Resistance of Cancers.” *Cell Death & Disease* 11 (9): 797. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>.
150. Liu, Shuo, Rui Li, Jin Qian, Jiabin Sun, Guowen Li, Jianliang Shen, and Yan Xie. 2020. “Combination Therapy of Doxorubicin and Quercetin on Multidrug-Resistant Breast Cancer and Their Sequential Delivery by Reduction-Sensitive Hyaluronic Acid-Based Conjugate/ D - α -Tocopheryl Poly(Ethylene Glycol) 1000 Succinate Mixed Micelles.” *Molecular Pharmaceutics* 17 (4): 1415–27. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00138>.
151. Liu, Si-Yen, I-Chung Liu, and Tiao-Yin Lin. 2016. “Truncated *Escherichia Coli* Thioredoxin Induces Proliferation of Human Blood Mononuclear Cells and Production of Reactive Oxygen Species as Well as Proinflammatory Cytokines: Truncated *E. Coli* Thioredoxin Induces

- Proliferation of PBMCs.” *Cell Biochemistry and Function* 34 (4): 226–32.
<https://doi.org/10.1002/cbf.3180>.
152. Liu, Yaping, Dongzhu Duan, Juan Yao, Baoxin Zhang, Shoujiao Peng, HuiLong Ma, Yanlin Song, and Jianguo Fang. 2014. “Dithiaarsanes Induce Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in HL-60 Cells by Selectively Targeting Thioredoxin Reductase.” *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (12): 5203–11.
<https://doi.org/10.1021/jm500221p>.
153. Liu, Yingmei, and Wang Min. 2002. “Thioredoxin Promotes ASK1 Ubiquitination and Degradation to Inhibit ASK1-Mediated Apoptosis in a Redox Activity-Independent Manner.” *Circulation Research* 90 (12): 1259–66.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000022160.64355.62>.
154. Liu, Yue, Zhen-Gang Tang, Jian-Quan Yang, Yi Zhou, Ling-Hu Meng, Heng Wang, and Cai-Li Li. 2017. “Low Concentration of Quercetin Antagonizes the Invasion and Angiogenesis of Human Glioblastoma U251 Cells.” *OncoTargets and Therapy* Volume 10 (August): 4023–28.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S136821>.
155. Liu, Zhi, Guangjing Zhu, Robert H. Getzenberg, and Robert W. Veltri. 2015. “The Upregulation of PI3K/Akt and MAP Kinase Pathways Is Associated with Resistance of Microtubule-Targeting Drugs in Prostate Cancer: PI3K/Akt AND MAPK IN PCa A MULTIDRUG RESISTANCE.” *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (7): 1341–49. <https://doi.org/10.1002/jcb.25091>.
156. Lu, Jun, and Arne Holmgren. 2014a. “The Thioredoxin Antioxidant System.” *Free Radical Biology and Medicine* 66 (January): 75–87.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>.
157. Lu, Jun, and Arne Holmgren. 2014b. “The Thioredoxin Superfamily in Oxidative Protein Folding.” *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (3): 457–70.
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.5849>.
158. Lu, Jun, Laura V. Papp, Jianguo Fang, Salvador Rodriguez-Nieto, Boris Zhivotovsky, and Arne Holmgren. 2006. “Inhibition of Mammalian

- Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity.” *Cancer Research* 66 (8): 4410–18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3310>.
159. Luo, Siou-Min, Yi-Ping Wu, Li-Chun Huang, Shih-Ming Huang, and Dueng-Yuan Hueng. 2021. “The Anti-Cancer Effect of Four Curcumin Analogues on Human Glioma Cells.” *Oncotargets and Therapy* Volume 14 (August): 4345–59. <https://doi.org/10.2147/OTT.S313961>.
160. Lv, Qi-zhuang, Jin-tao Long, Zi-feng Gong, Ke-yi Nong, Xiao-mei Liang, Ting Qin, Wei Huang, and Lei Yang. 2021. “Current State of Knowledge on the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Polyphenolic Compounds.” *Natural Product Communications* 16 (7): 1934578X2110277. <https://doi.org/10.1177/1934578X211027745>.
161. Ma, Jun, Zhenxian Zhao, Kaiming Wu, Zhe Xu, and Kuanzhi Liu. 2016. “MCL-1 Is the Key Target of Adjuvant Chemotherapy to Reverse the Cisplatin-Resistance in NSCLC.” *Gene* 587 (2): 147–54. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.054>.
162. Ma, Yuefan, Zihan Xiu, Zhiyuan Zhou, Bingyu Huang, Jiao Liu, Xiaofeng Wu, Sanzhong Li, and Xudong Tang. 2019. “Cytochalasin H Inhibits Angiogenesis *via* the Suppression of HIF-1 α Protein Accumulation and VEGF Expression through PI3K/AKT/P70S6K and ERK1/2 Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer Cells.” *Journal of Cancer* 10 (9): 1997–2005. <https://doi.org/10.7150/jca.29933>.
163. Mahmood, Dler Faieeq Darweesh, Amna Abderrazak, Khadija El Hadri, Thomas Simmet, and Mustapha Rouis. 2013. “The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease.” *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (11): 1266–1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4757>.
164. Makovec, Tomaz. 2019. “Cisplatin and beyond: Molecular Mechanisms of Action and Drug Resistance Development in Cancer Chemotherapy.”

- Radiology and Oncology* 53 (2): 148–58. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>.
165. Manabe, Yasuko, Mayumi Takagi, Mio Nakamura-Yamada, Naoko Goto-Inoue, Masato Taoka, Toshiaki Isobe, and Nobuharu L. Fujii. 2014. “Redox Proteins Are Constitutively Secreted by Skeletal Muscle.” *The Journal of Physiological Sciences* 64 (6): 401–9. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0334-7>.
166. Manning, Brendan D., and Lewis C. Cantley. 2007. “AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.” *Cell* 129 (7): 1261–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>.
167. Marchand, Christophe H., Simona Fermani, Jacopo Rossi, Libero Gurrieri, Daniele Tedesco, Julien Henri, Francesca Sparla, Paolo Trost, Stéphane D. Lemaire, and Mirko Zaffagnini. 2019. “Structural and Biochemical Insights into the Reactivity of Thioredoxin H1 from *Chlamydomonas Reinhardtii*.” *Antioxidants* 8 (1): 10. <https://doi.org/10.3390/antiox8010010>.
168. Marks, Douglas K., Robyn D. Gartrell, Margueritta El Asmar, Shuobo Boboila, Thomas Hart, Yan Lu, Qingfei Pan, et al. 2020. “Akt Inhibition Is Associated With Favorable Immune Profile Changes Within the Tumor Microenvironment of Hormone Receptor Positive, HER2 Negative Breast Cancer.” *Frontiers in Oncology* 10 (June): 968. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00968>.
169. Martin, Jennifer L. 1995. “Thioredoxin —a Fold for All Reasons.” *Structure* 3 (3): 245–50. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X).
170. Masoud, Georgina N., and Wei Li. 2015. “HIF-1 α Pathway: Role, Regulation and Intervention for Cancer Therapy.” *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5 (5): 378–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>.
171. Mateus, Paola G., Vanessa G. Wolf, Maiara S. Borges, and Valdecir F. Ximenes. 2018. “Quercetin: Prooxidant Effect and Apoptosis in Cancer.” In

- Studies in Natural Products Chemistry*, 58:265–88. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00009-X>.
172. Matsuzawa, Atsushi. 2017. “Thioredoxin and Redox Signaling: Roles of the Thioredoxin System in Control of Cell Fate.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 617 (March): 101–5. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.011>.
173. Minatel, Igor Otavio, Cristine Vanz Borges, Maria Izabela Ferreira, Hector Alonzo Gomez Gomez, Chung-Yen Oliver Chen, and Giuseppina Pace Pereira Lima. 2017. “Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability.” In *Phenolic Compounds - Biological Activity*, edited by Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango, and Maria del Rosario Garcia-Mateos. InTech. <https://doi.org/10.5772/66368>.
174. Miranda-Vizueté, Antonio, Anastasios E. Dandimopoulos, Jose Rafael Pedrajas, Jan-Ake Gustafsson, and Giannis Spyrou. 1999. “Human Mitochondrial Thioredoxin Reductase. cDNA Cloning, Expression and Genomic Organization.” *European Journal of Biochemistry* 261 (2): 405–12. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00286.x>.
175. Mishra, Murli, Hong Jiang, Lisha Wu, Hedy A. Chawsheen, and Qiou Wei. 2015. “The Sulfiredoxin–Peroxiredoxin (Srx–Prx) Axis in Cell Signal Transduction and Cancer Development.” *Cancer Letters* 366 (2): 150–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.002>.
176. Mitchell, Douglas A., Sarah U. Morton, Nathaniel B. Fernhoff, and Michael A. Marletta. 2007. “Thioredoxin Is Required for S-Nitrosation of Procaspase-3 and the Inhibition of Apoptosis in Jurkat Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (28): 11609–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704898104>.
177. Mo, Fei, Yinan Xiao, Hao Zeng, Dian Fan, Jinen Song, Xiaobei Liu, Meng Luo, and Xuelei Ma. 2021. “Curcumin-Induced Global Profiling of Transcriptomes in Small Cell Lung Cancer Cells.” *Frontiers in Cell and*

178. Mohammadi, Fariba, Arash Soltani, Atefeh Ghahremanloo, Hossein Javid, and Seyed Isaac Hashemy. 2019. "The Thioredoxin System and Cancer Therapy: A Review." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 84 (5): 925–35. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03912-4>.
179. Momenimovahed, Zohre, Azita Tiznobaik, Safoura Taheri, and Hamid Salehiniya. 2019a. "Ovarian Cancer in the World: Epidemiology and Risk Factors." *International Journal of Women's Health* Volume 11 (April): 287–99. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>.
180. Monteiro, Hugo P., Fernando T. Ogata, and Arnold Stern. 2017. "Thioredoxin Promotes Survival Signaling Events under Nitrosative/Oxidative Stress Associated with Cancer Development." *Biomedical Journal* 40 (4): 189–99. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.002>.
181. Morelli, Ana Paula, Tharcísio Citrângulo Tortelli, Mariana Camargo Silva Mancini, Isadora Carolina Betim Pavan, Luiz Guilherme Salvino Silva, Matheus Brandemarte Severino, Daniela Campos Granato, et al. 2021. "STAT3 Contributes to Cisplatin Resistance, Modulating EMT Markers, and the mTOR Signaling in Lung Adenocarcinoma." *Neoplasia* 23 (10): 1048–58. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.08.003>.
182. Mougiakakos, Dimitrios, C. Christian Johansson, Regina Jitschin, Martin Böttcher, and Rolf Kiessling. 2011. "Increased Thioredoxin-1 Production in Human Naturally Occurring Regulatory T Cells Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress." *Blood* 117 (3): 857–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307041>.
183. Mourenza, Álvaro, Cristina Collado, Natalia Bravo-Santano, José A. Gil, Luís M. Mateos, and Michal Letek. 2020. "The Extracellular Thioredoxin Etrx3 Is Required for Macrophage Infection in *Rhodococcus Equi*." *Veterinary Research* 51 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00763-3>.

184. Mukohara, Toru. 2015. "PI3K Mutations in Breast Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications." *Breast Cancer: Targets and Therapy*, May, 111. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S60696>.
185. Mustacich, D., and G. Powis. 2000. "Thioredoxin Reductase." *The Biochemical Journal* 346 Pt 1 (February): 1–8.
186. Naama, Jasim Hilo, Ali A. Al-Temimi, and Ahmed A. Al-Amiery. 2010. "Study the Anticancer Activities of Ethanolic Curcumin Extract" 4 (5): 68–73.
187. Nakamura, Hajime, Hiroshi Masutani, and Junji Yodoi. 2006. "Extracellular Thioredoxin and Thioredoxin-Binding Protein 2 in Control of Cancer." *Seminars in Cancer Biology* 16 (6): 444–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.09.001>.
188. Navakoski de Oliveira, Kely, Vincent Andermark, Susanne von Grafenstein, Liliane A. Onambele, Gregor Dahl, Riccardo Rubbiani, Gerhard Wolber, et al. 2013. "Butyltin(IV) Benzoates: Inhibition of Thioredoxin Reductase, Tumor Cell Growth Inhibition, and Interactions with Proteins." *ChemMedChem* 8 (2): 256–64. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200505>.
189. Nguyen, Trang Thi Minh, Germain Gillet, and Nikolay Popgeorgiev. 2021. "Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (July): 702404. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702404>.
190. Nicolussi, Arianna, Sonia D’Inzeo, Carlo Capalbo, Giuseppe Giannini, and Anna Coppa. 2017. "The Role of Peroxiredoxins in Cancer." *Molecular and Clinical Oncology* 6 (2): 139–53. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1129>.
191. Noguera, Martín E., Diego S. Vazquez, Gerardo Ferrer-Sueta, William A. Agudelo, Eduardo Howard, Rodolfo M. Rasia, Bruno Manta, et al. 2017. "Structural Variability of E. Coli Thioredoxin Captured in the Crystal Structures of Single-Point Mutants." *Scientific Reports* 7 (1): 42343. <https://doi.org/10.1038/srep42343>.

192. Nordberg, Jonas, and Elias S.J. Arnér. 2001. “Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System” This Review Is Based on the Licentiate Thesis ‘Thioredoxin Reductase—Interactions with the Redox Active Compounds 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene and Lipoic Acid’ by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4.” *Free Radical Biology and Medicine* 31 (11): 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).
193. Oehninger, Luciano, Laura Nadine Küster, Claudia Schmidt, Alvaro Muñoz-Castro, Aram Prokop, and Ingo Ott. 2013. “A Chemical-Biological Evaluation of Rhodium(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes as Prospective Anticancer Drugs.” *Chemistry - A European Journal* 19 (52): 17871–80. <https://doi.org/10.1002/chem.201302819>.
194. Ogata, Fernando Toshio, Wagner Luiz Batista, Adriano Sartori, Tarsis Ferreira Gesteira, Hiroshi Masutani, Roberto Jun Arai, Junji Yodoi, Arnold Stern, and Hugo Pequeno Monteiro. 2013. “Nitrosative/Oxidative Stress Conditions Regulate Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) Expression and Thioredoxin-1 (TRX-1) Nuclear Localization.” Edited by Gianfranco Pintus. *PLoS ONE* 8 (12): e84588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084588>.
195. Ouyang, Yanfang, Yi Peng, Jing Li, Arne Holmgren, and Jun Lu. 2018. “Modulation of Thiol-Dependent Redox System by Metal Ions *via* Thioredoxin and Glutaredoxin Systems.” *Metallomics* 10 (2): 218–28. <https://doi.org/10.1039/C7MT00327G>.
196. Owusu-Brackett, Nicci, Ming Zhao, Argun Akcakanat, Kurt W. Evans, Erkan Yuca, Ecaterina Ileana Dumbrava, Filip Janku, and Funda Meric-Bernstam. 2020. “Targeting PI3K β Alone and in Combination with Chemotherapy or Immunotherapy in Tumors with PTEN Loss.” *Oncotarget* 11 (11): 969–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27503>.
197. Pandey, Kanti Bhooshan, and Syed Ibrahim Rizvi. 2009. “Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease.” *Oxidative*

Medicine and Cellular Longevity 2 (5): 270–78.
<https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.

198. Pannala, Venkat R., and Ranjan K. Dash. 2015. “Mechanistic Characterization of the Thioredoxin System in the Removal of Hydrogen Peroxide.” *Free Radical Biology and Medicine* 78 (January): 42–55.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.508>.
199. Paramasivam, M., R. Poi, H. Banerjee, and A. Bandyopadhyay. 2009. “High-Performance Thin Layer Chromatographic Method for Quantitative Determination of Curcuminoids in Curcuma Longa Germplasm.” *Food Chemistry* 113 (2): 640–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.051>.
200. Patton, Daniel T., Oliver A. Garden, Wayne P. Pearce, Louise E. Clough, Clare R. Monk, Eva Leung, Wendy C. Rowan, et al. 2006. “Cutting Edge: The Phosphoinositide 3-Kinase P110 δ Is Critical for the Function of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells.” *The Journal of Immunology* 177 (10): 6598–6602.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6598>.
201. Patwardhan, Raghavendra S., Deepak Sharma, and Santosh K. Sandur. 2022. “Thioredoxin Reductase: An Emerging Pharmacologic Target for Radiosensitization of Cancer.” *Translational Oncology* 17 (March): 101341.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101341>.
202. Pekkari, Klas, and Arne Holmgren. 2004. “Truncated Thioredoxin: Physiological Functions and Mechanism.” *Antioxidants & Redox Signaling* 6 (1): 53–61. <https://doi.org/10.1089/152308604771978345>.
203. Perin, Gelson, Diego Alves, Raquel G. Jacob, Angelita M. Barcellos, Liane K. Soares, and Eder J. Lenardão. 2016. “Synthesis of Organochalcogen Compounds Using Non-Conventional Reaction Media.” *ChemistrySelect* 1 (2): 205–58. <https://doi.org/10.1002/slct.201500031>.
204. Peterson, Timothy R., Mathieu Laplante, Carson C. Thoreen, Yasemin Sancak, Seong A. Kang, W. Michael Kuehl, Nathanael S. Gray, and David M. Sabatini. 2009. “DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in

- Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival.” *Cell* 137 (5): 873–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>.
205. Piddock, Rachel, Kristian Bowles, and Stuart Rushworth. 2017. “The Role of PI3K Isoforms in Regulating Bone Marrow Microenvironment Signaling Focusing on Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma.” *Cancers* 9 (12): 29. <https://doi.org/10.3390/cancers9040029>.
206. Plugis, Nicholas M., Nielson Weng, Qinglan Zhao, Brad A. Palanski, Holden T. Maecker, Aida Habtezion, and Chaitan Khosla. 2018. “Interleukin 4 Is Inactivated via Selective Disulfide-Bond Reduction by Extracellular Thioredoxin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (35): 8781–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805288115>.
207. Powis, Garth, D.Lynn Kirkpatrick, Miguel Angulo, and Amanda Baker. 1998. “Thioredoxin Redox Control of Cell Growth and Death and the Effects of Inhibitors.” *Chemico-Biological Interactions* 111–112 (April): 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00148-8).
208. Powis, Garth, and William R Montfort. 2001. “Properties and Biological Activities of Thioredoxins.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41 (1): 261–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.261>.
209. Prast-Nielsen, Stefanie, Marcus Cebula, Irina Pader, and Elias S.J. Arnér. 2010. “Noble Metal Targeting of Thioredoxin Reductase — Covalent Complexes with Thioredoxin and Thioredoxin-Related Protein of 14kDa Triggered by Cisplatin.” *Free Radical Biology and Medicine* 49 (11): 1765–78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.008>.
210. Qu, Kai, Ting Lin, Zhixin Wang, Sinan Liu, Hulin Chang, Xinsen Xu, Fandi Meng, et al. 2014. “Reactive Oxygen Species Generation Is Essential for Cisplatininduced Accelerated Senescence in Hepatocellular Carcinoma.” *Frontiers of Medicine* 8 (2): 227–35. <https://doi.org/10.1007/s11684-014-0327-1>.

211. Rainha, João, Daniela Gomes, Lígia R. Rodrigues, and Joana L. Rodrigues. 2020. "Synthetic Biology Approaches to Engineer *Saccharomyces Cerevisiae* towards the Industrial Production of Valuable Polyphenolic Compounds." *Life* 10 (5): 56. <https://doi.org/10.3390/life10050056>.
212. Ranganathan, Santhalakshmi, Devaraj Halagowder, and Niranjali Devaraj Sivasithambaram. 2015. "Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells." Edited by Pankaj K Singh. *PLOS ONE* 10 (10): e0141370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141370>.
213. Raninga, Prahlad V., Giovanna Di Trapani, and Kathryn F. Tonissen. 2014. "Cross Talk between Two Antioxidant Systems, Thioredoxin and DJ-1: Consequences for Cancer." *Oncoscience* 1 (1): 95–110. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.12>.
214. Rashidi, Zahra, Ashraf Aleyasin, Mojtaba Eslami, Saeid Nekoonam, Adib Zendedel, Mojdeh Bahramrezaie, and Fardin Amidi. 2019. "Quercetin Protects Human Granulosa Cells against Oxidative Stress via Thioredoxin System." *Reproductive Biology* 19 (3): 245–54. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.07.002>.
215. Reich, Hans J., and Robert J. Hondal. 2016. "Why Nature Chose Selenium." *ACS Chemical Biology* 11 (4): 821–41. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00031>.
216. Rhee, Sue Goo, Ho Zoon Chae, and Kanghwa Kim. 2005. "Peroxiredoxins: A Historical Overview and Speculative Preview of Novel Mechanisms and Emerging Concepts in Cell Signaling." *Free Radical Biology and Medicine* 38 (12): 1543–52. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>.
217. Richter, Joel D., and Nahum Sonenberg. 2005. "Regulation of Cap-Dependent Translation by eIF4E Inhibitory Proteins." *Nature* 433 (7025): 477–80. <https://doi.org/10.1038/nature03205>.

218. Rojo de la Vega, Montserrat, Eli Chapman, and Donna D. Zhang. 2018. "NRF2 and the Hallmarks of Cancer." *Cancer Cell* 34 (1): 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
219. Ross, Julie A., and Christine M. Kasum. 2002. "DIETARY FLAVONOIDS : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety." *Annual Review of Nutrition* 22 (1): 19–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>.
220. Roy, Madhumita, and Sutapa Mukherjee. 2014. "Reversal of Resistance towards Cisplatin by Curcumin in Cervical Cancer Cells." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15 (3): 1403–10. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.3.1403>.
221. Rubbiani, Riccardo, Thomas N. Zehnder, Cristina Mari, Olivier Blacque, Koushik Venkatesan, and Gilles Gasser. 2014. "Anticancer Profile of a Series of Gold(III) (2-Phenyl)Pyridine Complexes." *ChemMedChem* 9 (12): 2781–90. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402446>.
222. Rudrapal, Mithun, Shubham J. Khairnar, Johra Khan, Abdulaziz Bin Dukhyil, Mohammad Azam Ansari, Mohammad N. Alomary, Fahad M. Alshabrimi, Santwana Palai, Prashanta Kumar Deb, and Rajlakshmi Devi. 2022. "Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action." *Frontiers in Pharmacology* 13 (February): 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>.
223. Ryoo, In-geun, Bo-hyun Choi, Sae-Kwang Ku, and Mi-Kyoung Kwak. 2018. "High CD44 Expression Mediates P62-Associated NFE2L2/NRF2 Activation in Breast Cancer Stem Cell-like Cells: Implications for Cancer Stem Cell Resistance." *Redox Biology* 17 (July): 246–58. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.015>.
224. Saad, Ibnalwalid, Craig T. Fournier, Rickesha L. Wilson, Rajesh Lakshmanan, Vaithinathan Selvaraju, Mahesh Thirunavukkarasu, J. Alexander

- Palesty, David W. McFadden, and Nilanjana Maulik. 2018. “Thioredoxin-1 Augments Wound Healing and Promote Angiogenesis in a Murine Ischemic Full-Thickness Wound Model.” *Surgery* 164 (5): 1077–86. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.05.045>.
225. Saccoccia, Fulvio, Francesco Angelucci, Giovanna Boumis, Maurizio Brunori, Adriana E. Miele, David L. Williams, and Andrea Bellelli. 2012. “On the Mechanism and Rate of Gold Incorporation into Thiol-Dependent Flavoreductases.” *Journal of Inorganic Biochemistry* 108 (March): 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.005>.
226. Saha, Shilpi, Arghya Adhikary, Pushpak Bhattacharyya, Tanya Das, and Gaurisankar Sa. 2012. “Death by Design: Where Curcumin Sensitizes Drug-Resistant Tumours.” *Anticancer Research* 32 (7): 2567–84.
227. Šamec, Dunja, Erna Karalija, Ivana Šola, Valerija Vujčić Bok, and Branka Salopek-Sondi. 2021. “The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure.” *Plants* 10 (1): 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>.
228. Sandalova, Tatyana, Liangwei Zhong, Ylva Lindqvist, Arne Holmgren, and Gunter Schneider. 2001. “Three-Dimensional Structure of a Mammalian Thioredoxin Reductase: Implications for Mechanism and Evolution of a Selenocysteine-Dependent Enzyme.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (17): 9533–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.171178698>.
229. Sanz-Barrio, Ruth, Alicia Fernández-San Millán, Jon Carballeda, Patricia Corral-Martínez, José M. Seguí-Simarro, and Inmaculada Farran. 2012. “Chaperone-like Properties of Tobacco Plastid Thioredoxins f and m.” *Journal of Experimental Botany* 63 (1): 365–79. <https://doi.org/10.1093/jxb/err282>.
230. Saraswati, Sarita, Shakti Kumar, and Abdulqader A Alhaider. 2013. “ α -Santalol Inhibits the Angiogenesis and Growth of Human Prostate Tumor Growth by Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2-Mediated

- AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathway.” *Molecular Cancer* 12 (1): 147.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-147>.
231. Sasada, T, S Iwata, N Sato, Y Kitaoka, K Hirota, K Nakamura, A Nishiyama, Y Taniguchi, A Takabayashi, and J Yodoi. 1996. “Redox Control of Resistance to Cis-Diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): Protective Effect of Human Thioredoxin against CDDP-Induced Cytotoxicity.” *Journal of Clinical Investigation* 97 (10): 2268–76. <https://doi.org/10.1172/JCI118668>.
232. Scalbert, Augustin, Claudine Manach, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jiménez. 2005. “Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (4): 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>.
233. Schmidt, Claudia, Bianka Karge, Rainer Misgeld, Aram Prokop, Raimo Franke, Mark Brönstrup, and Ingo Ott. 2017. “Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects.” *Chemistry - A European Journal* 23 (8): 1869–80. <https://doi.org/10.1002/chem.201604512>.
234. Schmitz, Kj, H Lang, J Wohlschlaeger, Gc Sotiropoulos, H Reis, Kw Schmid, and Ha Baba. 2007. “AKT and ERK1/2 Signaling in Intrahepatic Cholangiocarcinoma.” *World Journal of Gastroenterology* 13 (48): 6470. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i48.6470>.
235. Schwertassek, Ulla, Yves Balmer, Marcus Gutscher, Lars Weingarten, Marc Preuss, Johanna Engelhard, Monique Winkler, and Tobias P Dick. 2007. “Selective Redox Regulation of Cytokine Receptor Signaling by Extracellular Thioredoxin-1.” *The EMBO Journal* 26 (13): 3086–97. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601746>.
236. Seco-Cervera, Marta, Pilar González-Cabo, Federico Pallardó, Carlos Romá-Mateo, and José García-Giménez. 2020. “Thioredoxin and Glutaredoxin Systems as Potential Targets for the Development of New Treatments in

- Friedreich's Ataxia." *Antioxidants* 9 (12): 1257.
<https://doi.org/10.3390/antiox9121257>.
237. Sengupta, Rajib, Lucia Coppo, Pradeep Mishra, and Arne Holmgren. 2019. "Glutathione-Glutaredoxin Is an Efficient Electron Donor System for Mammalian p53R2–R1-Dependent Ribonucleotide Reductase." *Journal of Biological Chemistry* 294 (34): 12708–16.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008752>.
238. Shafabakhsh, Rana, and Zatollah Asemi. 2019. "Quercetin: A Natural Compound for Ovarian Cancer Treatment." *Journal of Ovarian Research* 12 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4>.
239. Shakibaei, Mehdi, Ali Mobasher, Cora Lueders, Franziska Busch, Paviz Shayan, and Ajay Goel. 2013. "Curcumin Enhances the Effect of Chemotherapy against Colorectal Cancer Cells by Inhibition of NF-κB and Src Protein Kinase Signaling Pathways." Edited by Bharat B. Aggarwal. *PLoS ONE* 8 (2): e57218.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057218>.
240. Shang, Wenjing, Zhongdong Xie, Fengying Lu, Daoquan Fang, Tianbin Tang, Ruichun Bi, Lingli Chen, and Lei Jiang. 2019. "Increased Thioredoxin-1 Expression Promotes Cancer Progression and Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (February): 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/9291683>.
241. Sharapov, Mars G., Sergey V. Gudkov, Vadim Z. Lankin, and Vladimir I. Novoselov. 2021. "Role of Glutathione Peroxidases and Peroxiredoxins in Free Radical-Induced Pathologies." *Biochemistry (Moscow)* 86 (11): 1418–33.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110067>.
242. Sharifi-Rad, Javad, Youssef El Rayess, Alain Abi Rizk, Carmen Sadaka, Raviella Zgheib, Wissam Zam, Simona Sestito, et al. 2020. "Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications."

Frontiers in Pharmacology 11 (September): 01021.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01021>.

243. Shelar, Sandeep B., Kamila K. Kaminska, Shridhivya A. Reddy, Dilip Kumar, Chong-Teik Tan, Victor C. Yu, Jun Lu, Arne Holmgren, Thilo Hagen, and Eng-Hui Chew. 2015. “Thioredoxin-Dependent Regulation of AIF-Mediated DNA Damage.” *Free Radical Biology and Medicine* 87 (October): 125–36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.029>.
244. Shen, Hui, Jianfen Shen, Huan Pan, Longsheng Xu, Han Sheng, Beibei Liu, and Ming Yao. 2021. “Curcumin Analog B14 Has High Bioavailability and Enhances the Effect of Anti-breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo.” *Cancer Science* 112 (2): 815–27. <https://doi.org/10.1111/cas.14770>.
245. Shields, Hazel J., Annika Traa, and Jeremy M. Van Raamsdonk. 2021. “Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (February): 628157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>.
246. Shu, Nan, Per Hägglund, Huan Cai, Clare L. Hawkins, and Michael J. Davies. 2020. “Modification of Cys Residues in Human Thioredoxin-1 by p-Benzoquinone Causes Inhibition of Its Catalytic Activity and Activation of the ASK1/P38-MAPK Signalling Pathway.” *Redox Biology* 29 (January): 101400. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101400>.
247. Sies, Helmut, Carsten Berndt, and Dean P. Jones. 2017. “Oxidative Stress.” *Annual Review of Biochemistry* 86 (1): 715–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
248. Slika, Hasan, Hadi Mansour, Nadine Wehbe, Suzanne A. Nasser, Rabah Iratni, Gheyath Nasrallah, Abdullah Shaito, Tarek Ghaddar, Firas Kobeissy, and Ali H. Eid. 2022. “Therapeutic Potential of Flavonoids in Cancer: ROS-Mediated Mechanisms.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146 (February): 112442. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>.

249. Sökmen, Münevver, and M. Akram Khan. 2016. "The Antioxidant Activity of Some Curcuminoids and Chalcones." *Inflammopharmacology* 24 (2–3): 81–86. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0264-5>.
250. Sorice, Maurizio, Roberta Misasi, Gloria Riitano, Valeria Manganelli, Stefano Martellucci, Agostina Longo, Tina Garofalo, and Vincenzo Mattei. 2021. "Targeting Lipid Rafts as a Strategy Against Coronavirus." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (February): 618296. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.618296>.
251. Sos, Martin L., Mirjam Koker, Barbara A. Weir, Stefanie Heynck, Rosalia Rabinovsky, Thomas Zander, Jens M. Seeger, et al. 2009. "PTEN Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR." *Cancer Research* 69 (8): 3256–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4055>.
252. Srivastava, Nishtha S, and Rai Ajit K Srivastava. 2019. "Curcumin and Quercetin Synergistically Inhibit Cancer Cell Proliferation in Multiple Cancer Cells and Modulate Wnt/ β -Catenin Signaling and Apoptotic Pathways in A375 Cells." *Phytomedicine* 52 (January): 117–28. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.224>.
253. Srivastava, Shikha, Ranganatha R. Somasagara, Mahesh Hegde, Mayilaadumveetil Nishana, Satish Kumar Tadi, Mrinal Srivastava, Bibha Choudhary, and Sathees C. Raghavan. 2016. "Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis." *Scientific Reports* 6 (1): 24049. <https://doi.org/10.1038/srep24049>.
254. Su, Qiongli, Mei Peng, Yuqing Zhang, Wanjun Xu, Kwame Oteng Darko, Ting Tao, Yanjun Huang, Xiaojun Tao, and Xiaoping Yang. 2016. "Quercetin Induces Bladder Cancer Cells Apoptosis by Activation of AMPK Signaling Pathway." *American Journal of Cancer Research* 6 (2): 498–508.

255. Sudati, Jéssie Haigert, Pablo Andrei Nogara, Rogério Aquino Saraiva, Caroline Wagner, Eduardo Eliezer Alberto, Antonio Luiz Braga, Roselei Fachinetto, Paulo Cesar Piquini, and João Batista Teixeira Rocha. 2018. “Diselenoamino Acid Derivatives as GPx Mimics and as Substrates of TrxR: *In Vitro* and *in Silico* Studies.” *Organic & Biomolecular Chemistry* 16 (20): 3777–87. <https://doi.org/10.1039/C8OB00451J>.
256. Sui, Hua, Shu-Fang Pan, Yu Feng, Bao-Hui Jin, Xuan Liu, Li-Hong Zhou, Feng-Gang Hou, et al. 2014. “Zuo Jin Wan Reverses P-Gp-Mediated Drug-Resistance by Inhibiting Activation of the PI3K/Akt/NF-κB Pathway.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14 (1): 279. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-279>.
257. Sujobert, P. 2005. “Essential Role for the P110 Isoform in Phosphoinositide 3-Kinase Activation and Cell Proliferation in Acute Myeloid Leukemia.” *Blood* 106 (3): 1063–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3225>.
258. Sun, Shibo, Yici Zhang, Weiping Xu, Yue Zhang, Rui Yang, Jianli Guo, Shui Guan, Qiang Ma, Kun Ma, and Jianqiang Xu. 2021. “Chlorophyllin Inhibits Mammalian Thioredoxin Reductase 1 and Triggers Cancer Cell Death.” *Antioxidants* 10 (11): 1733. <https://doi.org/10.3390/antiox10111733>.
259. Sun, Yu, Leahana M Rowehl, Liqun Huang, Gerardo G Mackenzie, Kvetoslava Vrankova, Despina Komninou, and Basil Rigas. 2012. “Phospho-Ibuprofen (MDC-917) Suppresses Breast Cancer Growth: An Effect Controlled by the Thioredoxin System.” *Breast Cancer Research* 14 (1): R20. <https://doi.org/10.1186/bcr3105>.
260. Sznarkowska, Alicja, Anna Kostecka, Katarzyna Meller, and Krzysztof Piotr Bielawski. 2017. “Inhibition of Cancer Antioxidant Defense by Natural Compounds.” *Oncotarget* 8 (9): 15996–16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13723>.

261. Tang, Si-Min, Xue-Ting Deng, Jian Zhou, Quan-Peng Li, Xian-Xiu Ge, and Lin Miao. 2020. "Pharmacological Basis and New Insights of Quercetin Action in Respect to Its Anti-Cancer Effects." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 121 (January): 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>.
262. Tavender, Timothy J., Alyson M. Sheppard, and Neil J. Bulleid. 2008. "Peroxiredoxin IV Is an Endoplasmic Reticulum-Localized Enzyme Forming Oligomeric Complexes in Human Cells." *Biochemical Journal* 411 (1): 191–99. <https://doi.org/10.1042/BJ20071428>.
263. Thao, Tran Hoang Dieu, Vo Thi Ngoc Dung, and Duy Quang Dao. 2019. "Antioxidant vs . pro-Oxidant Activities of Quercetin in Aqueous Phase: A Density Functional Theory Study: Antioxidant vs . pro-Oxidant Activities of Quercetin in Aqueous Phase: A Density Functional Theory Study." *Vietnam Journal of Chemistry* 57 (6): 696–701. <https://doi.org/10.1002/vjch.201900085>.
264. Theodore, Melanie, Yumiko Kawai, Jianqi Yang, Yuliya Kleshchenko, Sekhar P. Reddy, Fernando Villalta, and Ifeanyi J. Arinze. 2008. "Multiple Nuclear Localization Signals Function in the Nuclear Import of the Transcription Factor Nrf2." *Journal of Biological Chemistry* 283 (14): 8984–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709040200>.
265. Tonelli, Claudia, Iok In Christine Chio, and David A. Tuveson. 2018. "Transcriptional Regulation by Nrf2." *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (17): 1727–45. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
266. Torre, Lindsey A., Britton Trabert, Carol E. DeSantis, Kimberly D. Miller, Goli Samimi, Carolyn D. Runowicz, Mia M. Gaudet, Ahmedin Jemal, and Rebecca L. Siegel. 2018. "Ovarian Cancer Statistics, 2018: Ovarian Cancer Statistics, 2018." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (4): 284–96. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>.
267. Townsend, Danyelle M, and Kenneth D Tew. 2003. "The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance." *Oncogene* 22 (47): 7369–75. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.

268. Tretter, Verena, Beatrix Hochreiter, Marie Louise Zach, Katharina Krenn, and Klaus Ulrich Klein. 2021. "Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1): 106. <https://doi.org/10.3390/ijms23010106>.
269. Tsai, Te-Fu, ThomasI-Sheng Hwang, Ji-Fan Lin, Hung-En Chen, Shan-Che Yang, Yi-Chia Lin, and Kuang-Yu Chou. 2019. "Suppression of Quercetin-Induced Autophagy Enhances Cytotoxicity through Elevating Apoptotic Cell Death in Human Bladder Cancer Cells." *Urological Science* 30 (2): 58. https://doi.org/10.4103/UROS.UROS_22_18.
270. Tsiailanis, Antonis D., Alexander Renziehausen, Sofia Kiriakidi, Eirinaios I. Vrettos, Georgios S. Markopoulos, Nisar Sayyad, Baydaa Hirmiz, et al. 2020. "Enhancement of Glioblastoma Multiforme Therapy through a Novel Quercetin-Losartan Hybrid." *Free Radical Biology and Medicine* 160 (November): 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.007>.
271. Tungmunnithum, Duangjai, Areeya Thongboonyou, Apinan Pholboon, and Aujana Yangsabai. 2018. "Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview." *Medicines* 5 (3): 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>.
272. Vafadar, Asma, Zahra Shabaninejad, Ahmad Movahedpour, Farzaneh Fallahi, Mona Taghavipour, Younes Ghasemi, Maryam Akbari, et al. 2020. "Quercetin and Cancer: New Insights into Its Therapeutic Effects on Ovarian Cancer Cells." *Cell & Bioscience* 10 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00397-0>.
273. Vásquez-Espinal, Alejandro, Osvaldo Yañez, Edison Osorio, Carlos Areche, Olimpo García-Beltrán, Lina María Ruiz, Bruce K. Cassels, and William Tiznado. 2019. "Theoretical Study of the Antioxidant Activity of Quercetin Oxidation Products." *Frontiers in Chemistry* 7 (November): 818. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00818>.

274. Vieira-Frez, Flávia Cristina, Camila Caviquioli Sehaber-Sierakowski, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, Gleison Daion Piovezana Bossolani, Waldiceu Aparecido Verri, Rafael Campos do Nascimento, Flávia Alesandra Guarnier, et al. 2020. “Anti- and pro-Oxidant Effects of Quercetin Stabilized by Microencapsulation on Interstitial Cells of Cajal, Nitroergic Neurons and M2-like Macrophages in the Jejunum of Diabetic Rats.” *NeuroToxicology* 77 (March): 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.01.011>.
275. Vladu, Alina Florentina, Denisa Ficai, Alexandra Gabriela Ene, and Anton Ficai. 2022. “Combination Therapy Using Polyphenols: An Efficient Way to Improve Antitumoral Activity and Reduce Resistance.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (18): 10244. <https://doi.org/10.3390/ijms231810244>.
276. Volodina, Yulia L., Alexander S. Tikhomirov, Lyubov G. Dezhenkova, Alla A. Ramonova, Anastasia V. Kononova, Daria V. Andreeva, Dmitry N. Kaluzhny, et al. 2021. “Thiophene-2-Carboxamide Derivatives of Anthraquinone: A New Potent Antitumor Chemotype.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 221 (October): 113521. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113521>.
277. Wakasugi, N, Y Tagaya, H Wakasugi, A Mitsui, M Maeda, J Yodoi, and T Tursz. 1990. “Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor/Thioredoxin, Produced by Both Human T-Lymphotropic Virus Type I- and Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphocytes, Acts as an Autocrine Growth Factor and Synergizes with Interleukin 1 and Interleukin 2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (21): 8282–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8282>.
278. Waksman, G., T. S. Krishna, C. H. Williams, and J. Kuriyan. 1994. “Crystal Structure of Escherichia Coli Thioredoxin Reductase Refined at 2 Å Resolution. Implications for a Large Conformational Change during Catalysis.” *Journal of Molecular Biology* 236 (3): 800–816.

279. Waldman, Alex D., Jill M. Fritz, and Michael J. Lenardo. 2020. "A Guide to Cancer Immunotherapy: From T Cell Basic Science to Clinical Practice." *Nature Reviews Immunology* 20 (11): 651–68. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.
280. Walton, Paul A., Chantal Brees, Celien Lismont, Oksana Apanasets, and Marc Franssen. 2017. "The Peroxisomal Import Receptor PEX5 Functions as a Stress Sensor, Retaining Catalase in the Cytosol in Times of Oxidative Stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864 (10): 1833–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.013>.
281. Wang, J., M. Kobayashi, K. Sakurada, M. Imamura, T. Moriuchi, and M. Hosokawa. 1997. "Possible Roles of an Adult T-Cell Leukemia (ATL)-Derived Factor/Thioredoxin in the Drug Resistance of ATL to Adriamycin." *Blood* 89 (7): 2480–87.
282. Wang, X.-J., Z. Sun, N. F. Villeneuve, S. Zhang, F. Zhao, Y. Li, W. Chen, et al. 2008. "Nrf2 Enhances Resistance of Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs, the Dark Side of Nrf2." *Carcinogenesis* 29 (6): 1235–43. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>.
283. Ward, Ashley B., Hina Mir, Neeraj Kapur, Dominique N. Gales, Patrick P. Carriere, and Shailesh Singh. 2018. "Quercetin Inhibits Prostate Cancer by Attenuating Cell Survival and Inhibiting Anti-Apoptotic Pathways." *World Journal of Surgical Oncology* 16 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1400-z>.
284. Watson, Walter H., Jan Pohl, William R. Montfort, Olga Stuchlik, Matthew S. Reed, Garth Powis, and Dean P. Jones. 2003. "Redox Potential of Human Thioredoxin 1 and Identification of a Second Dithiol/Disulfide Motif." *Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 33408–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211107200>.
285. Wei, Bin, and Fenghe Li. 2021. "Mechanisms of Trx2/ASK1-Mediated Mitochondrial Injury in Pemphigus Vulgaris." Edited by Adam Reich. *BioMed*

Research International 2021 (March): 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2021/2471518>.

286. Wei, Yaming, Xiaozhe Cao, Yinxian Ou, Jihong Lu, Chuanping Xing, and Rongliang Zheng. 2001. “SeO₂ Induces Apoptosis with Down-Regulation of Bcl-2 and up-Regulation of P53 Expression in Both Immortal Human Hepatic Cell Line and Hepatoma Cell Line.” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490 (2): 113–21. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00149-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00149-2).
287. Weir, Nathan M., Karuppaiyah Selvendiran, Vijay Kumar Kutala, Liyue Tong, Shilpa Vishwanath, Murugesan Rajaram, Susheela Tridandapani, Shrikant Anant, and Periannan Kuppusamy. 2007. “Curcumin Induces G2/M Arrest and Apoptosis in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cells by Modulating Akt and P38 mAPK.” *Cancer Biology & Therapy* 6 (2): 178–84. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.2.3577>.
288. Welsh, Sarah J., William T. Bellamy, Margaret M. Briehl, and Garth Powis. 2002. “The Redox Protein Thioredoxin-1 (Trx-1) Increases Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Protein Expression: Trx-1 Overexpression Results in Increased Vascular Endothelial Growth Factor Production and Enhanced Tumor Angiogenesis.” *Cancer Research* 62 (17): 5089–95.
289. Wen, Chunjie, Lijuan Fu, Jiafeng Huang, Yi Dai, Bin Wang, Ge Xu, Lanxiang Wu, and Honghao Zhou. 2019. “Curcumin Reverses Doxorubicin Resistance via Inhibition the Efflux Function of ABCB4 in Doxorubicin-resistant Breast Cancer Cells.” *Molecular Medicine Reports*, April. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10180>.
290. Williams, Robert J, Jeremy P.E Spencer, and Catherine Rice-Evans. 2004. “Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?” *Free Radical Biology and Medicine* 36 (7): 838–49. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>.

291. Wu, Mengyao, Chujun Deng, Tak-Ho Lo, Ka-Ying Chan, Xiang Li, and Chi-Ming Wong. 2022. "Peroxiredoxin, Senescence, and Cancer." *Cells* 11 (11): 1772. <https://doi.org/10.3390/cells11111772>.
292. Xiao, Guo-Qiang, Bao-Xia Liang, Shu-Han Chen, Tian-Miao Ou, Xian-Zhang Bu, and Ming Yan. 2012. "3-Nitro-2 H -Chromenes as a New Class of Inhibitors against Thioredoxin Reductase and Proliferation of Cancer Cells." *Archiv Der Pharmazie* 345 (10): 767–70. <https://doi.org/10.1002/ardp.201200121>.
293. Xie, Manxin, Ziyi Fu, Jianxiang Cao, Yuan Liu, Jie Wu, Qing Li, and Yun Chen. 2018. "MicroRNA-132 and microRNA-212 Mediate Doxorubicin Resistance by down-Regulating the PTEN-AKT/NF-κB Signaling Pathway in Breast Cancer." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102 (June): 286–94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.088>.
294. Xu, Jun, Qiang Su, Mingxia Gao, Qingsong Liang, Junfeng Li, and Xu Chen. 2019. "Differential Expression And Effects Of Peroxiredoxin-6 On Drug Resistance And Cancer Stem Cell-Like Properties In Non-Small Cell Lung Cancer." *OncoTargets and Therapy* Volume 12 (December): 10477–86. <https://doi.org/10.2147/OTT.S211125>.
295. Xu, Wenbin, Shangdan Xie, Xin Chen, Shuya Pan, Hongfei Qian, and Xueqiong Zhu. 2021. "Effects of Quercetin on the Efficacy of Various Chemotherapeutic Drugs in Cervical Cancer Cells." *Drug Design, Development and Therapy* Volume 15 (February): 577–88. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S291865>.
296. Yamada, M., A. Tomida, H. Yoshikawa, Y. Taketani, and T. Tsuruo. 1996. "Increased Expression of Thioredoxin/Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor in Cisplatin-Resistant Human Cancer Cell Lines." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2 (2): 427–32.

297. Yamada, Manabu, Akihiro Tomida, Hiroyuki Yoshikawa, Yuji Taketani, and T. Tsuruo. 1997. "Overexpression of Thioredoxin Does Not Confer Resistance to Cisplatin in Transfected Human Ovarian and Colon Cancer Cell Lines." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 40 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1007/s002800050621>.
298. Yamaguchi, Hirohito, and Hong-Gang Wang. 2001. "The Protein Kinase PKB/Akt Regulates Cell Survival and Apoptosis by Inhibiting Bax Conformational Change." *Oncogene* 20 (53): 7779–86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204984>.
299. Yamawaki, Hideyuki, Judith Haendeler, and Bradford C. Berk. 2003. "Thioredoxin: A Key Regulator of Cardiovascular Homeostasis." *Circulation Research* 93 (11): 1029–33. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000102869.39150.23>.
300. Yan, Chao, David Siegel, Jeffery Newsome, Aurelie Chilloux, Christopher J. Moody, and David Ross. 2012. "Antitumor Indolequinones Induced Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells via Inhibition of Thioredoxin Reductase and Activation of Redox Signaling." *Molecular Pharmacology* 81 (3): 401–10. <https://doi.org/10.1124/mol.111.076091>.
301. Yang, Lin, Yanqing Liu, Mei Wang, Yayun Qian, Xiaoyun Dong, Hao Gu, Haibo Wang, Shiyu Guo, and Tadashi Hisamitsu. 2016. "Quercetin-Induced Apoptosis of HT-29 Colon Cancer Cells via Inhibition of the Akt-CSN6-Myc Signaling Axis." *Molecular Medicine Reports* 14 (5): 4559–66. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5818>.
302. Yang, Ling, Hong-Jian Xie, Ying-Ying Li, Xia Wang, Xing-Xin Liu, and Jia Mai. 2022. "Molecular Mechanisms of Platinum-based Chemotherapy Resistance in Ovarian Cancer (Review)." *Oncology Reports* 47 (4): 82. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8293>.

303. Yodoi, Junji, Yoshiyuki Matsuo, Hai Tian, Hiroshi Masutani, and Takashi Inamoto. 2017. “Anti-Inflammatory Thioredoxin Family Proteins for Medicare, Healthcare and Aging Care.” *Nutrients* 9 (10): 1081. <https://doi.org/10.3390/nu9101081>.
304. Yokomizo, A., M. Ono, H. Nanri, Y. Makino, T. Ohga, M. Wada, T. Okamoto, J. Yodoi, M. Kuwano, and K. Kohno. 1995. “Cellular Levels of Thioredoxin Associated with Drug Sensitivity to Cisplatin, Mitomycin C, Doxorubicin, and Etoposide.” *Cancer Research* 55 (19): 4293–96.
305. Yoshihara, Eiji. 2020. “TXNIP/TBP-2: A Master Regulator for Glucose Homeostasis.” *Antioxidants* 9 (8): 765. <https://doi.org/10.3390/antiox9080765>.
306. Yu, Le, Jessica Wei, and Pengda Liu. 2021. “Attacking the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway for Targeted Therapeutic Treatment in Human Cancer.” *Seminars in Cancer Biology*, June, S1044579X21001887. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.019>.
307. Yu, Yezhou, Giovanna Di Trapani, and Kathryn F. Tonissen. 2022. “Thioredoxin and Glutathione Systems: Cancer Cells’ Defensive Weapons Against Oxidative Stress.” In *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*, edited by Sajal Chakraborti, Bimal K. Ray, and Susanta Roychoudhury, 2407–20. Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9411-3_143.
308. Yu, Yonghao, Sang-Oh Yoon, George Pouligiannis, Qian Yang, Xiaojun Ma, Judit Villén, Neil Kubica, et al. 2011. “Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an mTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling.” *Science* 332 (6035): 1322–26. <https://doi.org/10.1126/science.1199484>.
309. Yu, Zeshun, Yingjun Wan, Yanni Liu, Jing Yang, Lei Li, and Weiming Zhang. 2016. “Curcumin Induced Apoptosis via PI3K/Akt-Signalling Pathways in SKOV3 Cells.” *Pharmaceutical Biology* 54 (10): 2026–32. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1139601>.

310. Zandi, Peiman, and Ewald Schnug. 2022. "Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective." *Biology* 11 (2): 155. <https://doi.org/10.3390/biology11020155>.
311. Zhang, Jian-Ye, Min-Ting Lin, Meng-Jia Zhou, Tao Yi, Yi-Na Tang, Si-Li Tang, Zhi-Jun Yang, Zhong-Zhen Zhao, and Hu-Biao Chen. 2015. "Combinational Treatment of Curcumin and Quercetin against Gastric Cancer MGC-803 Cells in Vitro." *Molecules* 20 (6): 11524–34. <https://doi.org/10.3390/molecules200611524>.
312. Zhang, Junmin, Xinming Li, Xiao Han, Ruijuan Liu, and Jianguo Fang. 2017. "Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy." *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (9): 794–808. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.001>.
313. Zhang, Junmin, Xinming Li, Zhengjia Zhao, Wenqing Cai, and Jianguo Fang. 2022. "Thioredoxin Signaling Pathways in Cancer." *Antioxidants & Redox Signaling*, August, ars.2022.0074. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0074>.
314. Zhang, Junmin, Qianhe Xu, Hong-Ying Yang, Minghao Yang, Jianguo Fang, and Kun Gao. 2021. "Inhibition of Thioredoxin Reductase by Santamarine Conferring Anticancer Effect in HeLa Cells." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (August): 710676. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.710676>.
315. Zhang, Junmin, Baoxin Zhang, Xinming Li, Xiao Han, Ruijuan Liu, and Jianguo Fang. 2019. "Small Molecule Inhibitors of Mammalian Thioredoxin Reductase as Potential Anticancer Agents: An Update." *Medicinal Research Reviews* 39 (1): 5–39. <https://doi.org/10.1002/med.21507>.
316. Zhang, Lianhua, Guoliang Yang, Ruiyun Zhang, Liang Dong, Haige Chen, Juanjie Bo, Wei Xue, and Yiran Huang. 2018. "Curcumin Inhibits Cell Proliferation and Motility via Suppression of TROP2 in Bladder Cancer Cells." *International Journal of Oncology*, May. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4423>.

317. Zhang, Rong, Rafia Al-Lamki, Lanfang Bai, Jeffrey W. Streb, Joseph M. Miano, John Bradley, and Wang Min. 2004. "Thioredoxin-2 Inhibits Mitochondria-Located ASK1-Mediated Apoptosis in a JNK-Independent Manner." *Circulation Research* 94 (11): 1483–91. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130525.37646.a7>.
318. Zhang, Tiantian, Qijuan Yuan, Zhipeng Gu, and Changhu Xue. 2019. "Advances of Proteomics Technologies for Multidrug-Resistant Mechanisms." *Future Medicinal Chemistry* 11 (19): 2573–93. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0507>.
319. Zhang, Xiaonan, Karthik Selvaraju, Amir Ata Saei, Padraig D'Arcy, Roman A. Zubarev, Elias SJ. Arnér, and Stig Linder. 2019. "Repurposing of Auranofin: Thioredoxin Reductase Remains a Primary Target of the Drug." *Biochimie* 162 (July): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.015>.
320. Zhang, Ying, Yeon Jin Roh, Seong-Jeong Han, Iha Park, Hae Min Lee, Yong Sik Ok, Byung Cheon Lee, and Seung-Rock Lee. 2020. "Role of Selenoproteins in Redox Regulation of Signaling and the Antioxidant System: A Review." *Antioxidants* 9 (5): 383. <https://doi.org/10.3390/antiox9050383>.
321. Zhaorigetu, Islam M Farrag, Amany Belal, Manal H. Al Badawi, Alsayed A. Abdelhady, Fawzy M. A. Abou Galala, Abdou El-Sharkawy, Asmaa A. EL-Dahshan, and Ahmed B. M. Mehany. 2021. "Antiproliferative, Apoptotic Effects and Suppression of Oxidative Stress of Quercetin against Induced Toxicity in Lung Cancer Cells of Rats: *In Vitro* and *In Vivo* Study." *Journal of Cancer* 12 (17): 5249–59. <https://doi.org/10.7150/jca.52088>.
322. Zheng, Bingjing, and David Julian McClements. 2020. "Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability." *Molecules* 25 (12): 2791. <https://doi.org/10.3390/molecules25122791>.
323. Zhou, Bing-Gang, Chang-Sheng Wei, Song Zhang, Zhi Zhang, and Huan-min Gao. 2018. "Matrine Reversed Multidrug Resistance of Breast

- Cancer MCF-7/ADR Cells through PI3K/AKT Signaling Pathway.” *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (5): 3885–91. <https://doi.org/10.1002/jcb.26502>.
324. Zhou, Binhua P., Yong Liao, Weiya Xia, Bill Spohn, Mong-Hong Lee, and Mien-Chie Hung. 2001. “Cytoplasmic Localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-Induced Phosphorylation in HER-2/Neu-Overexpressing Cells.” *Nature Cell Biology* 3 (3): 245–52. <https://doi.org/10.1038/35060032>.
325. Zhou, Hao, Yichong Ning, Guirong Zeng, Chang Zhou, and Xiaofeng Ding. 2021. “Curcumin Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells by Inactivating AKT.” *Oncology Reports* 45 (4): 11. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7962>.
326. Zuo, Jing, Zhe Zhang, Maochao Luo, Li Zhou, Edouard C. Nice, Wei Zhang, Chuang Wang, and Canhua Huang. 2022. “Redox Signaling at the Crossroads of Human Health and Disease.” *MedComm* 3 (2): e127. <https://doi.org/10.1002/mco2.127>.

Благодарности

После благодарности Аллаху, выражаю глубокую признательность научному руководителю проф., д.б.н. Е.В. Калининой, к.б.н. Е.В. Неборак, заведующему лабораторией С.И. Кутенкову, и всей кафедре биохимии им. акад. Т.Т.Березова РУДН.

Специалисту по учебной работе с аспирантами Н.П. Боднарук и начальник отдела аспирантура к.б.н. М.В. Гринберг и сотрудникам отдела аспирантуры И.Ю. Лумакиной и М.С. Гайтановой.

Д.м.н А.А. Штилю, Ю.Л. Володиной и сотрудникам лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Всем сотрудникам лаборатории молекулярной онкобиологии института биологии гена РАН.

Я хотела бы выразить особую благодарность моим родителям и моей семье, которые были постоянным источником финансовой и эмоциональной поддержки, силы и мотивации.

И, наконец, я хотела бы поблагодарить к.б.н. Виктора Вячеславовича Татарского, за дружбу, поддержку и научное руководство, без которого я бы не смогла завершить эту работу. Я очень горжусь быть его первой аспиранткой.