

УДК 576.385.5

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ NOX-2 И Nrf-2 СПОСОБСТВУЕТ ВОЗНИКНОВЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА (HCT-116) К ДЕЙСТВИЮ 5-ФТОРУРАЦИЛА*

© 2021 Б.Н. Вагхела¹, Ф.У. Вайдия¹, Ч. Патхак^{1,2**}

¹ School of Biological Sciences & Biotechnology, Indian Institute of Advanced Research, Koba Institutional Area, 382426 Gandhinagar, India; E-mail: cmpathak@iiar.res.in

² Amity Institute of Biotechnology, Amity University, 122413 Gurgaon, India

Поступила в редакцию 14.07.2020

После доработки 21.09.2020

Принята к публикации 21.09.2020

Изменения внутриклеточной экспрессии редокс-генов и уровня соответствующих белков оказывают влияние на инвазию, метастазирование и лекарственную устойчивость при раке. Изоформы NADPH-оксидазы (NOX) представляют собой прооксидантные белки, которые генерируют в качестве первичного продукта активные формы кислорода (АФК). Нарушения регуляции экспрессии и активности NOX приводят к изменению уровня АФК, что прямо или косвенно оказывает влияние на сигнальные пути, определяющие гибель или выживание клеток при прогрессировании рака. Ядерный фактор Nrf-2 является индуцибельным фактором транскрипции, который участвует в транскрипции целого набора антиоксидантных генов и защищает опухолевые клетки от влияния окислительного стресса. Как NOX, так и Nrf-2 участвуют в регуляции редокс-гомеостаза внутри клеток, и нарушение регуляции их активности способствует возникновению окислительного стресса, который, в свою очередь, вносит вклад в прогрессирование различных типов рака. В то же время роль изоформ NOX и Nrf-2 в развитии фенотипа лекарственной резистентности до сих пор не выяснена. В настоящей работе нами была изучена связь между изоформами NOX и Nrf-2-опосредованным сигнальным путем и экспрессией гена *MDR1* в клетках карциномы толстой кишки (HCT-116/R). Для получения резистентных клеток HCT-116/R была достигнута повышенная экспрессия гена *MDR1*; в этих клетках регистрировали уровень активации NOX и образование АФК. Кроме того, нами была проведена оценка роли изоформ NOX и Nrf-2 в гибели клеток HCT116/R в результате апоптоза, индуцированного 5-фторурацилом (5-FU). Мы обнаружили, что клетки HCT-116/R демонстрируют повышенную экспрессию HIF-1 α , Nrf-2 и HO-1 и обладают повышенной устойчивостью к действию 5-FU. В этих клетках также была повышена экспрессия и активность NOX-2. Кроме того, в клетках был отмечен повышенный уровень АФК. Следует отметить, что воздействие HDC, который является специфическим ингибитором NOX-2, на клетки HCT-116/R приводило к снижению уровня АФК. В то же время воздействие на клетки специфических ингибиторов, таких как HDC (NOX-2) и ML-385 (Nrf-2), усиливало 5-FU-опосредованную гибель клеток HCT-116/R в результате апоптоза, что позволяет предположить, что NOX-2 и Nrf-2 участвуют в развитии у клеток устойчивости к действию лекарств. Таким образом, гены *NOX-2* и *Nrf-2*, возможно, являются вновь выявленными ускорителями возникновения лекарственной устойчивости клеток колоректального рака, и они могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней для преодоления лекарственной резистентности при колоректальном раке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 5-фторурацил, лекарственная резистентность, HO-1, MDR1, NOX-2, Nrf-2, АФК.

DOI: 10.31857/S0320972521030039

ВВЕДЕНИЕ

Рак толстой кишки является одной из основных причин смерти во всем мире, и для него

характерен высокий уровень смертности [1]. Для лечения рака в основном применяются такие подходы, как химиотерапия и хирургические методы вмешательства. Однако опухолевые

Принятые сокращения: ABC – АТФ-связывающий кассетный транспортер; АФК – активные формы кислорода; DPBS – физиологический раствор Дульбекко; DPI – дифенилен-йодоний; 5-FU – 5-фторурацил; HDC – гистамин дигидрохлорид; H₂DCFDA – краситель 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат; *MDR1* – ген множественной лекарственной устойчивости 1; ML171 – ингибитор NOX-1; ML385 – ингибитора Nrf-2; MTT – краситель тиазолил синий тетразолий бромид; NBT – нитросиний тетразолий; NOX – NADPH-оксидазы, Nrf-2 – ядерный эритроид-подобный фактор 2; P-gp – P-гликопротеин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-221, 08.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

клетки после начала применения противораковых лекарств быстро становятся невосприимчивыми к действию химических препаратов. Возникновение устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических агентов является серьезным препятствием для успешного применения лекарств при терапии рака [2]. Возникновение фенотипов раковых клеток, устойчивых к действию лекарств, происходит в результате нарушения функционирования сложных молекулярных механизмов [3]. Механически различные нарушения функционирования клеток связаны с развитием лекарственной резистентности, которая проявляется в таких явлениях, как инактивация лекарств, изменения мишеней для действия лекарств, отток лекарств из клеток, репарация поврежденных участков ДНК, ингибирование процесса гибели клеток, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT – epithelial to mesenchymal transition), свойственная клеткам гетерогенность, эпигенетические эффекты и любые комбинации этих механизмов [4, 5].

Есть неопровержимые доказательства того, что развитие лекарственной резистентности раковых клеток обусловлено повышением экспрессии белков, участвующих в выбросе лекарств из клеток или в снижении уровня поглощаемого клетками противоракового вещества. Одним из наиболее хорошо изученных механизмов лекарственной устойчивости раковых клеток является повышение экспрессии белков семейства АТР-связывающего кассетного транспортера (ABC – АТР-binding cassette), которые способствуют оттоку из клеток противоопухолевых лекарств и снижают их содержание в клетках [6]. ABC-транспортеры используют энергию гидролиза АТР для транспорта субстратов через плазматическую мембрану против градиента их концентрации [7]. В настоящее время идентифицированы 49 членов семейства ABC-транспортеров, которые подразделяются на 7 подсемейств, начиная от ABCA и далее до ABCG. Все ABC-транспортеры содержат два нуклеотид-связывающих и два трансмембранных домена. ABC-транспортеры могут быть топологически классифицированы на основании последовательности нуклеотид-связывающего домена, известного как ABC-домен, который содержит консервативную ABC-последовательность. В ряде исследований было показано, что консервативная ABC-последовательность участвует в оттоке эндогенных молекул и ксенобиотиков из клеток [8]. Кроме того, было обнаружено, что в различных типах раковых клеток, в том числе при раке толстой кишки, печени, почек, поджелудочной железы и других, наблюдается повы-

шенная экспрессия гена *MDR1* [9], которая обеспечивает устойчивость клеток к действию самых различных нейтральных и катионных гидрофобных химиотерапевтических соединений, включая антрациклины, алкалоиды, таксаны, антибиотики и других [10].

Белки, поддерживающие в клетке окислительно-восстановительный (редокс) баланс, белки семейства NADPH-оксидаз (NOX) и первичный продукт их действия в виде активных форм кислорода (АФК) играют важную роль в канцерогенезе [11]. Ранее было показано, что АФК играют важную роль в определении судьбы клеток [12]. При низких концентрациях АФК участвуют в координации различных внутриклеточных сигнальных путей и клеточных ответов. Однако при повышенном уровне АФК индуцируют окислительный стресс и гибель клеток [13]. АФК, как известно, генерируются в ходе различных клеточных процессов в качестве конечного продукта метаболизма. NADPH-оксидаза, по сути, является сложной ферментативной системой, которая образует АФК в качестве основного продукта. NOX катализирует перенос электрона от молекулы NADPH на молекулярный кислород с образованием АФК. Семейство ферментов NOX состоит из семи членов, обозначаемых как NOX-1–NOX-5 и DUOX-1–DUOX-2 [14]. Существование разных изоформ NOX и их распределение среди различных тканей предполагает сложную роль этого семейства ферментов в поддержании редокс-гомеостаза внутри клеток [15]. Дисрегулированная активация и экспрессия NOX-опосредованной генерации АФК значительно способствует прогрессированию опухолевого процесса и метастазированию [16]. Показано, что изоформа NOX (NOX-1) поддерживает пролиферацию клеток и ассоциирована с прогрессированием рака толстой кишки [17]. В предыдущей работе мы показали, что переключение с изоформы NOX-1 на NOX-2 способствует возникновению инвазивных фенотипов клеток рака толстой кишки [18]. Также было показано, что ядерный эритроид-подобный фактор 2 (Nrf-2) является индуцибельным фактором транскрипции, который в основном участвует в транскрипции целого ряда антиоксидантных и цитопротективных генов. Nrf-2 защищает опухолевые клетки от окислительного стресса и способствует поддержанию внутриклеточного редокс-гомеостаза [19]. Однако участие изоформ NOX и Nrf-2 в развитии фенотипа лекарственной устойчивости в клетках рака толстой кишки изучено недостаточно. В настоящем исследовании нами была изучена роль редокс-белков, NOX-2 и Nrf-2, и их реакция на обработку клеток противорако-

вым агентом 5-фторурацилом (5-FU) в фенотипе лекарственной устойчивости клеток рака толстой кишки (HCT-116/R). Кроме того, мы также обнаружили, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 вызывает повышение чувствительности клеток HCT-116/R к действию 5-FU. Эти результаты могут свидетельствовать о непосредственном участии редокс-белков NOX-2 и Nrf-2 в регуляции окислительно-восстановительных процессов клетки при развитии лекарственной резистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Все реактивы для молекулярной биологии были приобретены в коммерческих фирмах. Среда RPMI-1640, физиологический раствор Дульбекко (DPBS), фетальная бычья сыворотка (FBS), краситель 5,6-CFDA, Аннексин-V (Alexa fluor 488), краситель пропидиум йодид (PI), набор для синтеза кДНК, краситель SYBR Green, антитела против Nrf-2, конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антикроличьи и антикозляные антитела («GIBCO», США); набор для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) («Takara Bio Inc.», Япония); нитросиний тетразолий (NBT), 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (H₂DCFDA), ингибитор NOX-1 (ML171), N-[4-[2,3-дигидро-1-(2-метилбензоил)-1H-индол-5-ил]-5-метил-2-тиазолил]-1,3-бензодиоксол-5 ацетамид (ML385), гистамин дигидрохлорид (HDC), тиазолил синий тетразолий бромид (MTT), трипановый синий, антимышинные конъюгированные с HRP антитела («Sigma-Aldrich», США); дифенилен-йодоний (DPI) («APEX BIO», США). Первичные антитела: антитела против NOX-1 (1/1000) и NOX-2 (1/500) («BioRad», США); антитела против MDR1 (1/1000) и β-актина (1/1000) («Cell Signaling Technology», США).

Линии клеток и их культивирование. Линия клеток колоректальной карциномы (HCT-116) поступила от Национального центра клеточной науки (NCCS), Пьюн, Индия. Клетки выращивали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин (2 ммоль/литр). Культуральная среда также содержала 10% фетальной бычьей сыворотки и смесь антибиотиков: пенициллин (5 мг/мл), стрептомицин (5 мг/мл) и неомицин (10 мг/мл) («GIBCO» и «Invitrogen», Великобритания). Клетки выдерживали в увлажненной атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе при 37 °C. В экспериментах использовали культивируемые клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста.

Трансфекция. Трансфекцию генов *MDR1* (pNaMDRwt Addgene Plasmid #10957) и *GFP-Nrf-2* (pcDNA3-EGFP-C4-Nrf-2 Addgene Plasmid #21549) осуществляли с помощью реагента Lipofectamine LTX («Invitrogen», Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HCT-116 рассеивали в соответствующие культуральные чашки и инкубировали в течение 16 ч. Исползованную среду меняли на свежую. Сначала раствор ДНК и липофектамин готовили в пробирках отдельно, согласно инструкциям производителя, затем их смешивали и инкубировали в течение 8 мин. После этого приготовленной смесью обрызгивали клетки и инкубировали в течение 48 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Клетки HCT-116, повышенно экспрессирующие MDR1, далее обозначали как клетки HCT-116/R.

Обработка 5-фторурацилом. С использованием ДМСО культуральной чистоты приготавливали концентрированный раствор противоракового агента 5-FU (50 мМ). Клетки HCT-116/R инкубировали с различными дозами 5-FU (1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) в течение 24 ч. Для определения влияния ингибиторов клетки HCT-116/R инкубировали с 5-FU (100 мкМ) с добавлением ингибиторов или без них в течение 24 ч.

Ингибирование NOX-2 и Nrf-2. Активность ферментов NOX-2 и Nrf-2 подавляли с помощью специфических ингибиторов. С использованием ДМСО культуральной чистоты приготавливали концентрированные растворы ингибитора NOX – DPI (10 мМ), специфического ингибитора NOX-1 – ML171 (0,5 мМ), специфического ингибитора NOX-2 – HDC (5 мМ) и специфического ингибитора Nrf-2 – ML385 (10 мМ). Клетки HCT-116/R обрабатывали DPI (10 мкМ) в течение 2 ч или ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ) в течение 4 ч. Для определения гибели клеток клетки HCT-116/R обрабатывали отдельно 5-FU (100 мкМ) или 5-FU вместе с ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ) в течение 24 ч. Кроме того, клетки HCT-116/R были предварительно обработаны DPI (10 мкМ) в течение 2 ч и затем 5-FU (100 мкМ) в течение 24 ч.

Морфологический анализ. Изменения морфологии клеток HCT-116 при их трансфекции наблюдали с помощью фильтра DIC в ярком поле микроскопа. Вкратце, клетки HCT-116 и HCT-116/R промывали буфером DPBS и наблюдали более 150 клеток в трех разных полях с использованием фильтра DIC (DP-71, IX81, «Olympus», Япония). Изображения клеток получали с помощью программы Image-Pro MC 6.1

(США) и анализировали с помощью программы NIH Image J, США.

Анализ накопления родамина 123. Окрашивание родамином 123 проводили, как описано ранее, с небольшими изменениями [20]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R промывали DPBS и окрашивали 10 мкМ родамина 123 (в HBSS) в течение 1 ч, и получали изображения с помощью программы Image-Pro MC 6.1 (США) на инвертированном флуоресцентном микроскопе (DP-71, IX81, «Olympus», Япония). Изображения анализировали с помощью программы NIH Image J (США).

Анализ распределения и накопления доксорубина внутри клеток. Внутриклеточное распределение и накопление доксорубина определяли, как сообщалось ранее [21]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R отмывали буфером DPBS, обрабатывали 5 мкМ доксорубина в течение 2 ч, и наблюдали за ними с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Определение АФК внутри клеток. За образованием АФК внутри клеток наблюдали с помощью красителя H₂DCFDA. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с H₂DCFDA (25 мкМ) в темноте в течение 20 мин при 37 °С. Планшет подвергали мониторингу величины флуоресценции молекул DCF при возбуждении 485 нм и излучении 525 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader, «Molecular Devices», США). Для качественного анализа внутриклеточных АФК клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с H₂DCFDA (25 мкМ) в течение 20 мин при 37 °С в темноте. После этого клетки промывали DPBS, а изображения получали с помощью программного обеспечения Image-Pro MC 6.1 (США) под инвертированным флуоресцентным микроскопом (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Определение активности NADPH-оксидазы с красителем нитросиний тетразолий. Активность NOX определяли с помощью метода с использованием красителя NBT, как описано ранее [22]. Принцип этого метода основан на восстановлении NBT до формазана NOX-зависимым супероксидом. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с 100 мкл раствора NBT (1 мг/мл в среде RPMI-1640) при 37 °С в течение 1 ч. Затем клетки разрушали с помощью 100 мкл ДМСО, и регистрировали поглощение при 570 нм. Результаты представляли в виде среднего значения процента поглощения в различных группах.

Определение значения IC₅₀ и анализ клеточной пролиферации. Значение полумаксимальной

ингибирующей концентрации (IC₅₀) 5-FU на клетки НСТ-116 и НСТ-116/R определяли с помощью красителя МТТ, как описано ранее [23]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R обрабатывали различными концентрациями (1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) 5-FU в течение 24 ч. Затем клетки инкубировали с 0,5 мг/мл раствора МТТ в течение 4 ч при 37 °С. После этого в каждую лунку добавляли 0,1 мл смеси SDS и HCl (10% SDS в 0,01 М HCl), тщательно перемешивали и инкубировали в темноте в течение 20 мин при 37 °С. Поглощение регистрировали в каждой лунке при 570 нм с референсной длиной волны при 650 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader SpectraMax M2^e, «Molecular Devices», США). Влияние 5-FU или ингибиторов на пролиферацию клеток НСТ-116 и НСТ-116/R оценивали с помощью МТТ. Результаты представлены в виде процента значения клеточной пролиферации в различных группах.

Определение гибели клеток. Оценку процесса гибели клеток проводили с помощью метода исключения красителя трипановый синий, как описано ранее [24]. Вкратце, клетки НСТ-116/R обрабатывали, как было описано ранее. После завершения инкубации клетки собирали и промывали один раз буфером DPBS. Затем равные количества суспензии клеток смешивали с трипановым синим, после чего подсчитывали количество живых и мертвых клеток в ярком поле микроскопа, и определяли процент погибших клеток, используя формулу (процент гибели клеток = (число мертвых клеток/общее количество клеток) × 100).

Определение ЛДГ. Цитотоксичный эффект 5-FU и ингибиторов оценивали с помощью набора для определения активности ЛДГ, согласно рекомендациям производителя. Вкратце, 1,5 × 10⁴ клеток НСТ-116/R обрабатывали либо 5-FU (100 мкМ) в отдельности или 5-FU (100 мкМ) с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). После этого собирали остаточную среду, смешивали с реакционной смесью, содержащей ЛДГ и раствор красителя, и инкубировали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Регистрировали оптическое поглощение при 490 нм с референсной длиной волны при 650 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader, SpectraMax M2^e, «Molecular Devices», США). Результаты представлены в виде процента цитотоксичности (высвобождение ЛДГ).

Окрашивание клеток Аннексином-V и пропидиум иодидом (PI). Оценку гибели клеток в результате апоптоза проводили по методу окраши-

вания клеток Аннексином-V/PI, как описано ранее [24]. Вкратце, клетки НСТ-116/R выращивали на покрытых поли-L-лизинем покровных стеклах и обрабатывали их, как описано ранее. Затем клетки окрашивали реагентом Аннексин-V (Alexa Fluor 488) в течение 20 мин с последующим окрашиванием PI в течение 5 мин и наблюдали за более чем 150 клетками в трех случайных полях с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток анализировали методом окрашивания CFDA. Вкратце, клетки НСТ-116/R обрабатывали только 5-FU (100 мкМ) или 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). Затем клетки окрашивали красителем CFDA (25 мкМ) в течение 20 мин и дважды промывали буфером DPBS. Окрашенные клетки анализировали с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP71, IX81, «Olympus», Япония).

Транслокация Nrf-2. Транслокацию GFP-Nrf-2 между ядром и цитоплазмой оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Вкратце, 4×10^4 клеток трансфицировали плазмидой с геном *MDR1*. Спустя 24 ч клетки трансфицировали *GFP-Nrf-2* и инкубировали в течение 24 ч, используя реагент Lipofectamine LTX с Plus-реагентом. После этого клетки отмывали DPBS и получали изображения с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Вестерн-блоттинг. Экспрессию белков *MDR1*, *HIF-1 α* , *Nrf-2*, *NOX-1*, *NOX-2* и β -актина оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга. Вкратце, 1×10^6 клеток трансфицировали плазмидой с геном *MDR1* в течение 48 ч. Через различные интервалы времени собирали клетки, их дважды промывали охлажденным до температуры льда буфером DPBS, лизировали в лизисном буфере (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 150 мМ CaCl₂, 1 мМ Na-ванадат, 0,05% Nonident P-40, набор ингибиторов протеаз) и помещали в лед на 30 мин. Затем клетки разрушали и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант собирали как лизат целых клеток. Концентрацию белка определяли с помощью BCA-набора для определения концентрации белка. Белки (50 мкг) разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном и 10%-ном SDS-PAGE геле, затем переносили на мембрану PVDF с помощью метода влажного электропереноса при 4 °С. Мембрану блокировали 3%-ным обезжиренным молоком в буфере TBST в течение

2 ч при комнатной температуре с последующей ночной инкубацией мембраны с первичными антителами при 4 °С. Затем мембрану обрабатывали вторичными антителами (1/3000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки визуализировали с помощью хемолюминесценции (EZ-ECL), согласно инструкциям производителя в темноте с использованием синей пленки «Kodak X-Omat blue film» («Kodak», США).

Экстракция РНК и ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Суммарную РНК экстрагировали с использованием реагента Trizol («Invitrogen», США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, осуществляли обратную транскрипцию 1 мкг общей РНК в кДНК с использованием набора для синтеза кДНК («Invitrogen», США). RT-qPCR проводили с использованием 96-луночного планшета MicroAmp fast optical 96-well PCR plates («Applied Biosystems», США) на приборе Step One plus real-time PCR detection system («Applied Biosystems», США). Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей кДНК (100 пмоль), SYBR Green master-mix (1 мкМ), каждый праймер и свободную от протеаз воду. В качестве эндогенного контроля использовали 18S рРНК, и уровни экспрессии мРНК для *NOX-1*, *NOX-2* и *HO-1* нормализовали относительно 18S рРНК. Используемые в работе праймеры приведены в таблице.

Статистическая обработка данных. Полученные данные были проанализированы с помощью *t*-критерия Стьюдента и метода ANOVA (односторонний дисперсионный анализ), а затем с помощью критерия Стьюдента–Ньюмана–Кеуласса (SNK – тест по параметрическим переменным) для проведения множественных сравнений с использованием программы Sigma plot 12.0 statistical analysis software. Значения $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$ рассматривались как статистически достоверные.

Перечень праймеров, использованных в данной работе

Название праймера	Последовательность праймера (5'–3')
NOX-1 F	GAGACAGGTGCCTTTTCCTG
NOX-1 R	CGGTGAGGAAGAGACGGTAG
NOX-2 F	CACATGCCCTTTGAGTGTTTG
NOX-2 R	GCCAGTGAGGTAGATGTTGTAG
HO-1 F	AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC
HO-1 R	AAAGCCCTACAGCAACTGTCCG
18s rRNA F	AGAAACGGCTACCACATCCAA
18s rRNA R	TGTCACCTACCTCCCCGTGTCA

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повышение экспрессии *MDR1* вызывает индукцию фенотипов лекарственной резистентности в клетках НСТ-116. В настоящей работе мы исследовали последствия повышенной экспрессии гена *MDR1* в клетках НСТ-116. Мы трансфицировали ген *MDR1* в клетки НСТ-116, и с помощью микроскопа проанализировали лекарственно-резистентные фенотипы. Мы обнаружили, что в клетках с повышенной экспрессией *MDR1* (НСТ-116/R) наблюдается образование внутриклеточных вакуолей в сравнении с клетками дикого типа (НСТ-116) (рис. 1, *a*). Затем мы проанализировали способность клеток НСТ-116/R снижать поглощение лекарств с помощью окрашивания родамином 123. Мы обнаружили, что в большинстве клеток НСТ-116 наблюдалась интенсивная флуоресценция родамина 123, в то время как клетки НСТ-116/R отличались слабой флуоресценцией. Это означает, что клетки с повышенной экспрессией *MDR1* в меньшей степени поглощают родамин 123 (рис. 1, *b*). Далее мы проанализировали внутриклеточное распределение и накопление доксорубина в обоих типах клеточных линий и обнаружили, что большинство клеток НСТ-116 демонстрировали заметную флуоресценцию доксорубина в ядре. Однако клетки НСТ-116/R не проявляли флуоресценции доксорубина в ядре и уменьшали флуоресценцию доксорубина в своей цитоплазме (рис. 1, *c*). Мы также получили подтверждение повышенной экспрессии *MDR1* с помощью иммуноблоттинга. Полученные нами результаты свидетельствовали о повышенной экспрессии *MDR1* в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 (рис. 1, *d*). Кроме того, полученные нами результаты показывали значительное повышение экспрессии HIF-1 α и Nrf-2. Этот результат позволил предположить, что повышение экспрессии *MDR1*, HIF-1 α и Nrf-2 связано с возникновением резистентности клеток к действию лекарств. Кроме того, мы также определили чувствительность клеток НСТ-116 и НСТ-116/R к действию 5-фторурацила. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации IC₅₀ для 5-FU в отношении клеток НСТ-116 и НСТ-116/R оказались равными ~241,40 и ~702,30 мкМ соответственно (рис. 1, *e*), что свидетельствовало о большей устойчивости клеток НСТ-116/R к действию 5-фторурацила. Таким образом, эти результаты означают, что повышение экспрессии *MDR1* способствует возникновению резистентных фенотипов клеток колоректальной карциномы человека (НСТ-116).

Повышение экспрессии мРНК для Nrf-2 и HO-1 связано с возникновением лекарственной резистентности клеток НСТ-116/R. Nrf-2 в основном ассоциирован с антиоксидантным ответом и детоксикацией клеток в результате регуляции различных генов-мишеней ARE [25]. В развитии лекарственной резистентности клеток при различных типах рака участвует сигнальная цепь Nrf-2/HO-1 [26]. Чтобы понять действительно ли сигнальная цепь Nrf-2/HO-1 задействована в клетках НСТ-116/R, мы проанализировали экспрессию и активацию фактора транскрипции Nrf-2. Мы обнаружили заметное повышение экспрессии Nrf-2 в клетках НСТ-116/R (рис. 1, *d*). Далее мы попытались исследовать активность Nrf-2, регистрируя транслокацию GFP-Nrf-2 в клетках НСТ-116/R. Мы обнаружили значительную экспрессию GFP-Nrf-2 в ядрах клеток НСТ-116/R (рис. 2, *a*). Однако накопление GFP-Nrf-2 также наблюдалось в цитоплазме клеток НСТ-116. Чтобы определить активность Nrf-2 в ядре, мы проанализировали экспрессию гена-мишени Nrf-2 (гена *HO-1*) на уровне мРНК. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 наблюдается повышенная экспрессия мРНК *HO-1* (рис. 2, *b*). Более того, обработка клеток НСТ-116/R препаратом ML385 (специфическим ингибитором Nrf-2) вызывала значительное снижение уровня активации Nrf-2 и экспрессии мРНК *HO-1* (рис. 2, *a* и *b*). В целом эти результаты свидетельствуют о том, что активация Nrf-2 и продукта нижележащего гена *HO-1* ассоциированы с развитием у клеток НСТ-116/R устойчивости к действию лекарств.

Повышение активности NOX и экспрессии NOX-2 приводит к увеличению образования АФК и способствует развитию устойчивости раковых клеток к действию лекарств. Известно, что активные формы кислорода вносят вклад в возникновение окислительного стресса и прогрессирование рака [27]. Ферменты семейства NOX являются одними из основных источников АФК внутри клетки [28]. В настоящем исследовании нам было интересно изучить участие NOX-опосредованной генерации АФК, связанной с лекарственной устойчивостью, при раке. Сначала мы изучили активность NOX в клетках НСТ-116 и НСТ-116/R. Полученные нами результаты показали существенное увеличение активности NOX в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 (рис. 3, *a*). Этот результат поставил вопрос о том, коррелирует ли повышенная активность NOX с экспрессией его изоформ NOX-1 и NOX-2. Мы изучили экспрессию NOX-1 и NOX-2 на уровне мРНК и белка и обнаружили

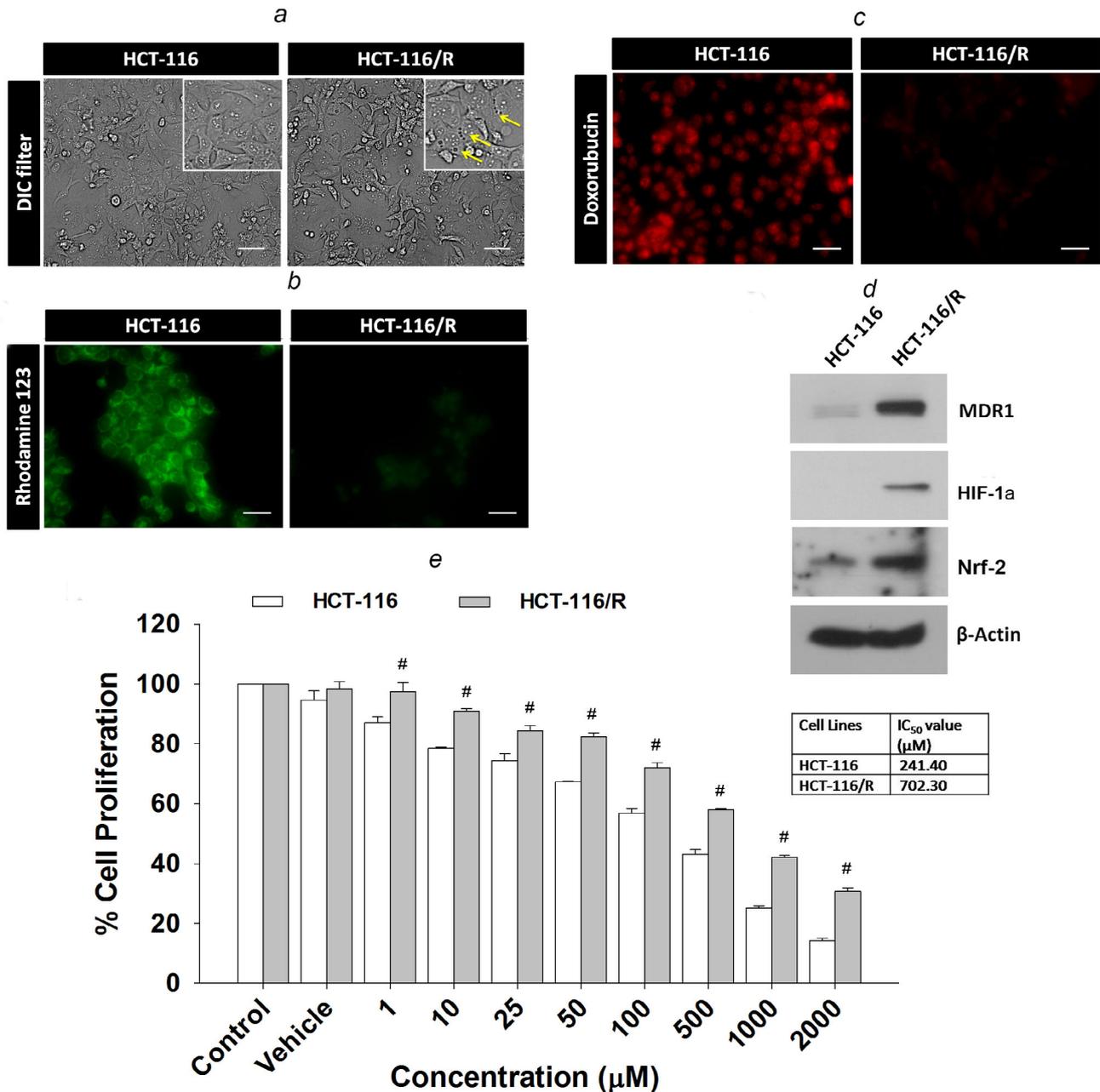


Рис. 1. Характеристика устойчивых к действию лекарств клеток HCT-116/R рака толстой кишки человека. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1*, и были обнаружены различные свойства лекарственной устойчивости. *a* – Морфологический анализ с использованием фильтра DIC. *b* – Окрашивание клеток родамином 123 и их анализ с помощью флуоресцентного микроскопа. *c* – Распределение и накопление доксорубина внутри клеток было проанализировано с помощью флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 20 мкм. *d* – Вестерн-блоттинг *MDR1*, *HIF-1α* и *Nrf-2*. В качестве контроля белковой нагрузки использовали β -актин. *e* – Влияние 5-FU (1, 10, 25, 50 мкМ, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) на пролиферацию клеток HCT-116 и HCT-116/R, определенное с помощью МТТ-анализа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как $\#p \leq 0,001$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (односторонний ANOVA и затем критерий SNK). (С цветными вариантами рис. 1–8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

ли, что уровень NOX-2 был резко повышен в клетках HCT-116/R (рис. 3, *b–d*). Однако экспрессия NOX-1 оставалась на прежнем уровне, что предполагает, что участие фермента NOX

в возникновении резистентности к лекарствам клеток рака толстой кишки у человека зависит от его изоформы (рис. 3, *b* и *c*). Кроме того, мы наблюдали за уровнем внутриклеточных АФК в

клетках HCT-116/R, используя флуоресцентный краситель H₂DCFDA, и обнаружили значительное повышение уровня АФК внутри клеток (рис. 3, *e*). Анализ с использованием микроскопа также подтвердил повышенный внутриклеточный уровень АФК в клетках HCT-116/R (рис. 3, *f* и *g*). Кроме того, чтобы подтвердить роль какой-либо конкретной изоформы NOX, мы обработали устойчивые к действию лекарств клетки HCT-116/R специфичными ингибиторами: DPI (ингибитор NOX), ML171 (специфичный ингибитор NOX-1), HDC (специфичный ингибитор NOX-2) и ML385 (ингибитор Nrf-2). DPI и HDC ингибировали активность NOX и образование АФК в клетках HCT-116/R в сравнении с контрольными клетками HCT-116/R. Однако ML171 и ML385 в незначительной степени ингибировали активацию NOX и образование АФК в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R (рис. 4, *a* и *b*). Таким образом, полученные нами результаты поз-

воляют предположить, что активация ферментов NOX и повышение экспрессии NOX-2 облегчает образование АФК при резистентности к действию лекарств клеток HCT-116/R.

Ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 способствует устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-FU и сенсibiliзирует клетки HCT-116/R к гибели. 5-фторурацил является антимиетаболитом, который препятствует синтезу ДНК и РНК раковых клеток [29]. Он широко используется для лечения различных типов рака, включая рак молочной железы, головы и шеи и рак толстой кишки [30, 31]. В настоящее время при лечении рака толстой кишки в основном используется 5-FU в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, и это приводит к существенному улучшению ситуации с выживаемостью больных [32]. Однако возникновение лекарственной резистентности ограничивает активность 5-FU. После того, как было обнаружено повышение экспрессии и активации

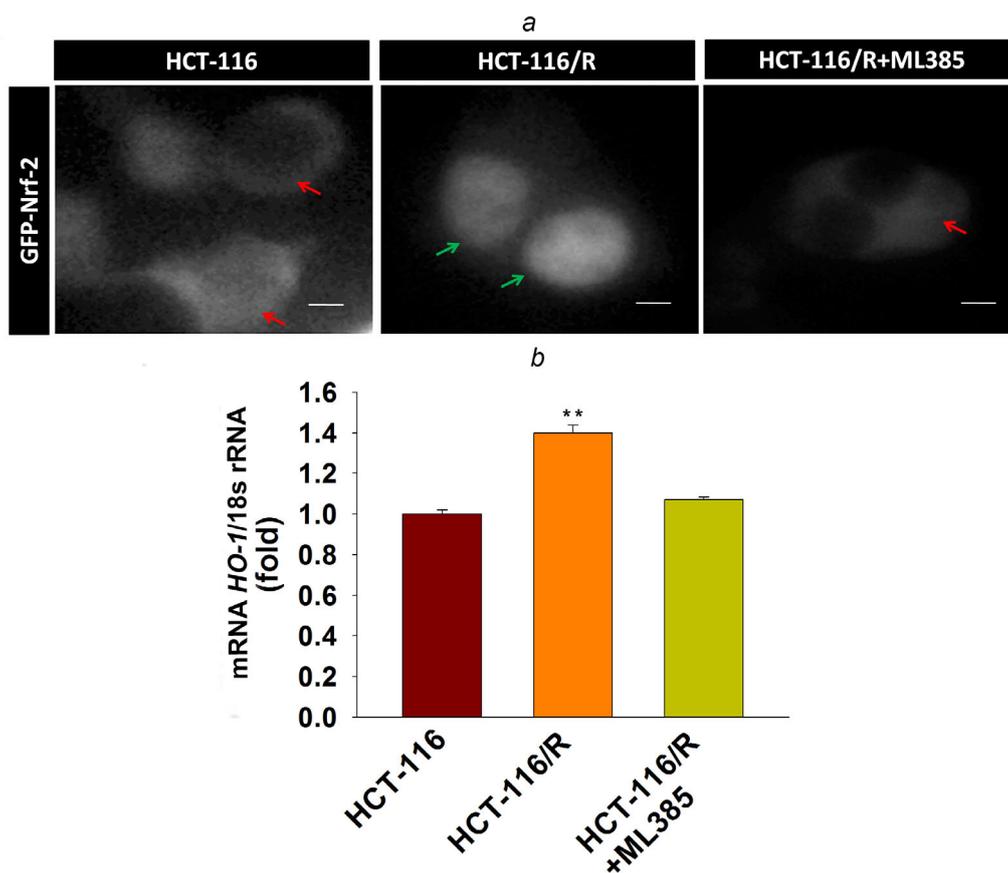


Рис. 2. Активация Nrf-2-зависимого сигнального пути в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R рака толстой кишки. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* с последующей обработкой ML385. При этом наблюдалась активация и накопление Nrf-2. *a* – Изучение транслокации GFP-Nrf-2. Зелеными стрелками показано накопление GFP-Nrf-2 в ядре, и красными стрелками обозначено накопление GFP-Nrf-2 в цитоплазме. Масштабная линейка – 5 мкм. *b* – Анализ *HO-1* с помощью RT-qPCR. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Достоверные различия определены при $**p \leq 0,01$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (*t*-критерий)

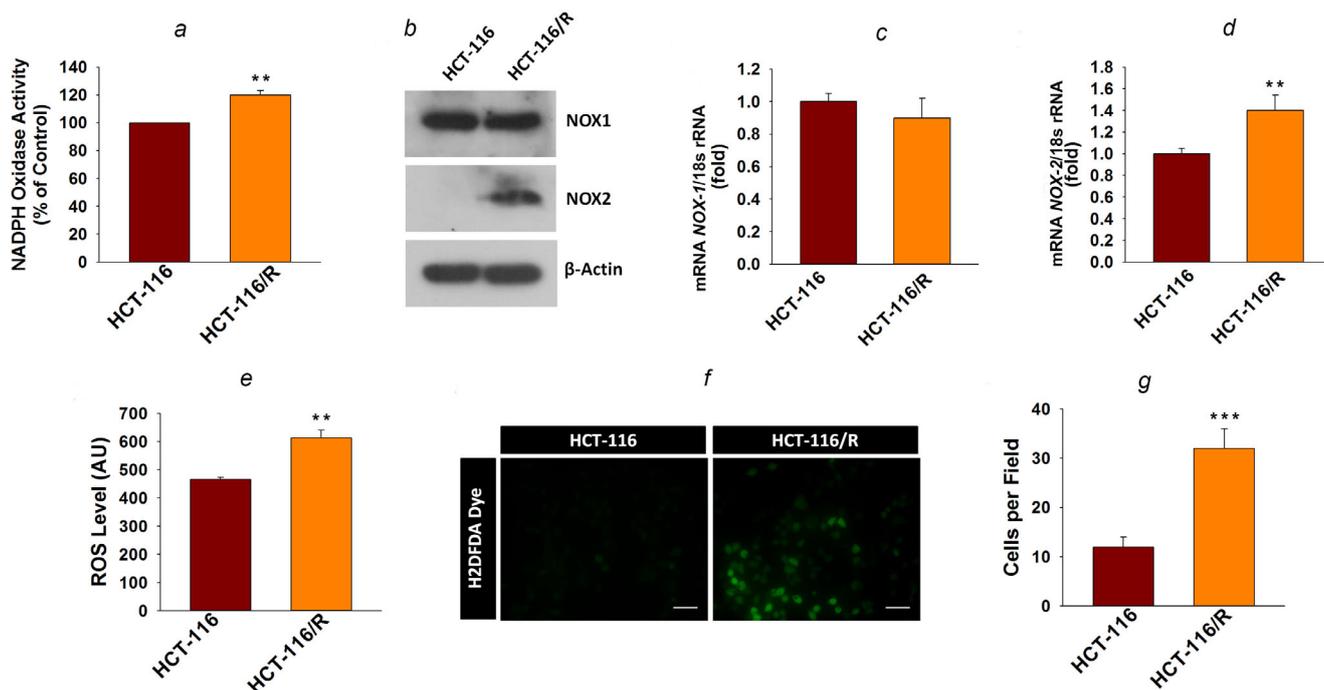


Рис. 3. Активация ферментов семейства NOX и образование АФК в клетках линии HCT-116/R, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 трансфицировали геном *MDR1* и регистрировали активацию и экспрессию ферментов NOX. *a* – Анализ активности NOX с помощью NBT-анализа. *b* – Вестерн-блоттинг белков NOX-1 и NOX-2. В качестве контроля белковой нагрузки использовали β -актин. RT-qPCR анализ *NOX-1* (*c*) и *NOX-2* (*d*). Уровень внутриклеточной генерации АФК определяли с помощью красителя H2DCFDA. *e* – Количественный анализ с использованием спектрофотометра. *f* и *g* – Количественный анализ с использованием флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 50 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (*t*-критерий)

NOX-2 и Nrf-2 в клетках HCT-116/R, мы поставили цель изучить роль активации NOX-2 и Nrf-2 в возникновении устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила. Для этого мы обработали клетки HCT-116/R 5-FU в отдельности и 5-FU вместе с ингибитором NOX (DPI) и ингибитором Nrf-2 (ML385). Оказалось, что обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с DPI и ML385 вызывает значительное ингибирование клеточной пролиферации и индуцирует гибель клеток по сравнению с их обработкой только 5-FU. Этот результат предполагает роль активации NOX и Nrf-2 в развитии у клеток устойчивости к действию 5-FU (рис. 5, *a* и *b*).

Чтобы выяснить роль отдельных изоформ NOX, мы обработали клетки HCT-116/R 5-FU вместе с ML171 (специфичный ингибитор NOX-1) и HDC (специфичный ингибитор NOX-2). Интересно, что обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с HDC приводила к ингибированию пролиферации клеток и индуцировала гибель клеток в сравнении с обработкой клеток только 5-FU (рис. 5, *a* и *b*). Однако обработка этих клеток 5-FU вместе с ML171 не оказывала заметного влияния на клеточную пролиферацию

и гибель клеток в сравнении с их обработкой только 5-FU (рис. 5, *a* и *b*). Эти результаты позволяют предположить, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 усиливает 5-FU-опосредованную гибель клеток HCT-116/R. Далее мы провели мониторинг высвобождения из клеток ЛДГ, чтобы оценить гибель клеток в результате некроза во всех группах клеток, но не смогли обнаружить значительного высвобождения ЛДГ при обработке клеток. Эти результаты позволяют предположить, что обработка 5-FU или 5-FU вместе с ингибиторами не вызывает некротическую гибель клеток (рис. 5, *c*). Также мы изучили морфологические изменения и жизнеспособность клеток после различных обработок и обнаружили, что обработка клеток 5-FU вместе с DPI, HDC и ML385 заметно изменила клеточную морфологию и снизила жизнеспособность клеток HCT-116/R (рис. 6, *a–c*). В то же время обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с ML171 не показала каких-либо существенных изменений в клеточной морфологии и жизнеспособности клеток по сравнению с обработкой только 5-FU. Этот результат позволяет предположить, что ингибирование активности

NOX-2 и Nrf-2 снижает жизнеспособность клеток HCT-116/R (рис. 6, *a–c*).

Чтобы изучить характер гибели клеток в результате их обработки, мы окрасили клетки Аннексином-V и PI. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток 5-FU с DPI, HDC и ML385 приводит к наибольшему числу Аннексин-V/PI-положительных клеток HCT-116/R по сравнению с клетками, обработанными 5-FU вместе с ML171 или только 5-FU (рис. 7, *a* и *b*). Этот результат говорит о том, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 способствует 5-FU-опосредованному апоптозу клеток HCT-116/R. Следовательно, полученные нами результаты позволяют предположить, что активация NOX-2 и Nrf-2 приводит к резистентности клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лекарственная резистентность — это явление, которое возникает при патологических состояниях клеток, приобретающих устойчивость к действию терапевтических агентов. Приобретение раковыми клетками устойчивости к действию лекарств является серьезным препятствием на пути успешного лечения рака. Хотя многие типы рака изначально чувствительны к химиотерапевтическим препаратам, со временем раковые клетки становятся резистентными к их действию благодаря влиянию многочисленных внутренних и внешних факторов [5]. Один из наиболее хорошо изученных механизмов лекарственной резистентности заключается в экспрессии белков семейства АТФ-связывающего кассетного транспортера. Три транспортера: белок множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR1), ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью белок 1 (MRP1) и белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP) участвуют в процессе лекарственной резистентности при различных типах рака [33]. Все эти транспортеры защищают раковые клетки от различных химиотерапевтических агентов. Белок MDR1 (P-gp, P-гликопротеин) был первым идентифицированным и широко изученным транспортным белком в различных моделях рака. Недавно были получены убедительные доказательства, показавшие, что сверхэкспрессия P-gp связана с развитием множественной лекарственной устойчивости (MDR) при раке. Таким образом, клетки, которые повышенно экспрессируют P-gp, проявляют перекрестную резистентность к множественным цитотоксическим препаратам и способ-

ствуют развитию множественной лекарственной устойчивости в раковых клетках. Развитие лекарственной устойчивости при раке толстой кишки является основным феноменом, ответственным за рецидив опухоли и снижение выживаемости пациентов [34]. Поэтому выявление новых регуляторов резистентности рака толстой кишки крайне необходимо.

Есть неопровержимые доказательства того, что нарушение регуляции редокс-белков и генов способствует устойчивости раковых клеток к действию лекарств [35]. Известно, что АФК нацелены на редокс-чувствительные белки и регулируют иммунный ответ, пролиферацию клеток, дифференцировку клеток и сигнализацию о гибели клеток. Внутриклеточные АФК в основном вырабатываются ферментами семейства NADPH-оксидаз в качестве основного продукта и участвуют в окислительно-восстановительном

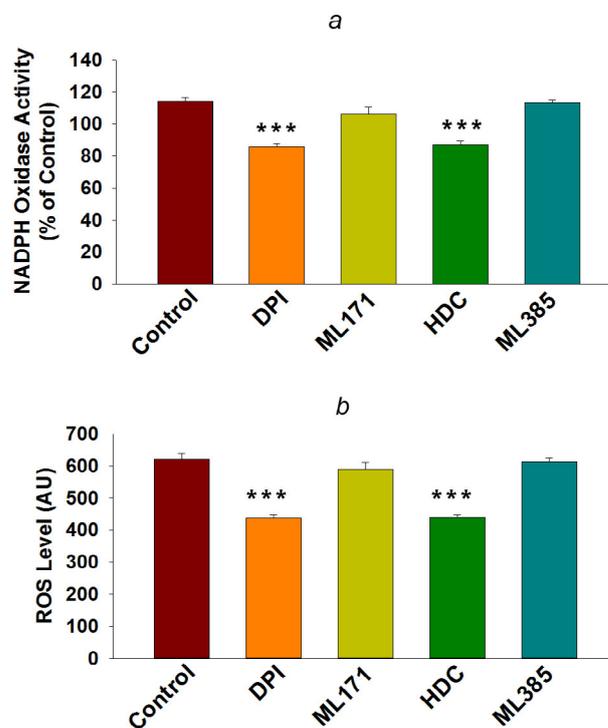


Рис. 4. NOX-2-опосредованное образование АФК в клетках HCT-116/R рака толстой кишки, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* и обработаны DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). В этих клетках регистрировали активацию белков NOX. *a* — Определение активности белков NOX с помощью NBT. *b* — Определение АФК с помощью спектрофотометра. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как *** $p \leq 0,001$ между необработанными и обработанными клетками (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

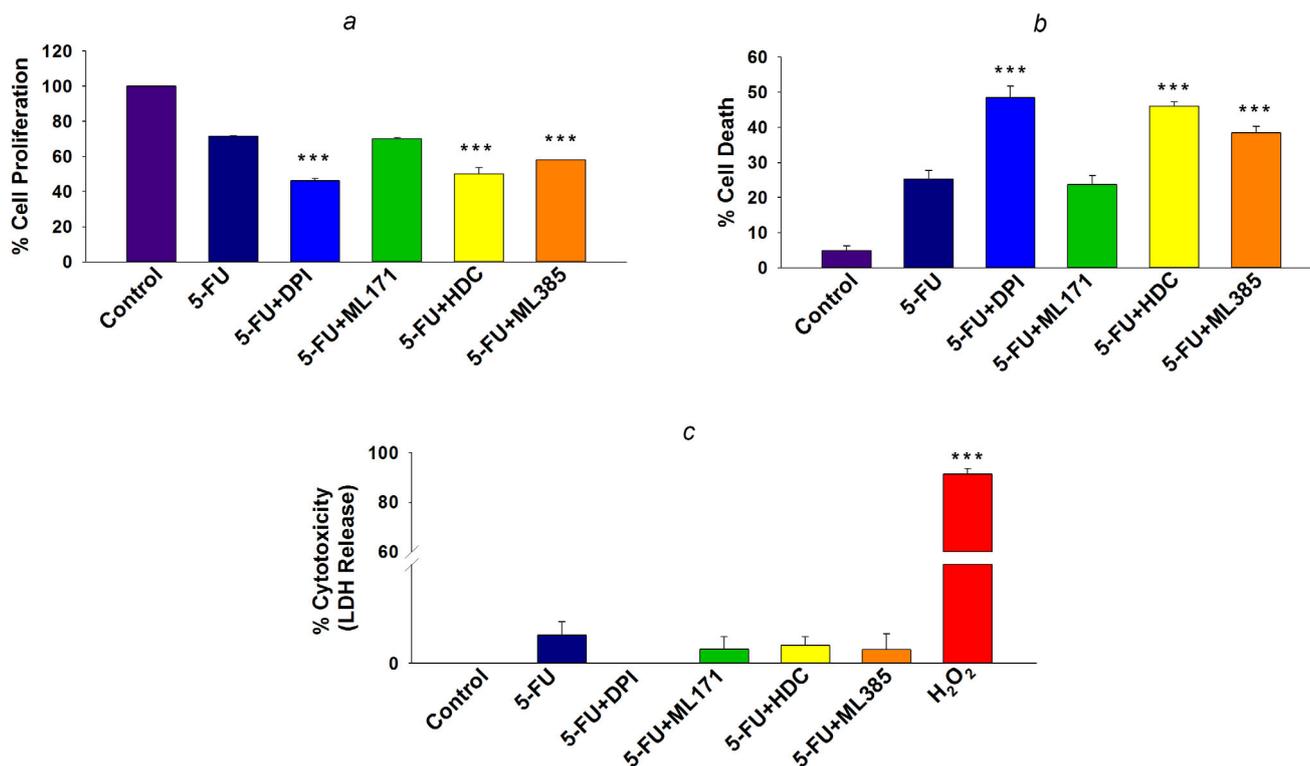


Рис. 5. Ингибирование активности NOX-2 способствует гибели клеток HCT-116/R рака толстой кишки человека, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* и обработаны либо 5-FU (100 мкМ) в отдельности или 5-FU (100 мкМ) с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). *a* – Анализ пролиферации клеток с помощью МТТ-анализа. *b* – Анализ гибели клеток с помощью трипанового синего. *c* – Определение высвобождения ЛДГ из клеток с помощью набора для определения ЛДГ. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как $***p \leq 0,001$ между обработкой клеток только 5-FU и обработкой клеток 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

гомеостазе клеток. Очевидно, что АФК, образуемые белками NOX, участвуют в развитии и прогрессировании различных типов рака [36]. В предыдущей работе было высказано предположение, что переключение экспрессии с NOX-1 на NOX-2 ассоциировано со злокачественной трансформацией клеток [18]. Действительно, было показано, что различные онкогены, включая RAS, регулируют экспрессию и активацию белка NOX-1 [37]. В отличие от NOX-1, другая изоформа, NOX-2, принимает участие в развитии инвазивных фенотипов клеток рака толстой кишки [18]. NOX-2 является первой изоформой NOX, для которой была показана преимущественная экспрессия в иммунных клетках, включая макрофаги, моноциты и нейтрофилы [38]. Недавно было показано, что переключение с изоформы NOX-1 на NOX-2 способствует развитию инвазивного фенотипа у клеток рака толстой кишки [18]. В целом эти данные позволяют предположить, что как NOX-1, так и NOX-2 участвуют в прогрессировании рака толстой кишки.

Nrf-2 является основным фактором транскрипции, который способствует транскрипции целого ряда антиоксидантных генов. При физиологических условиях белок Nrf-2 подвергается постоянной деградации протеазой Keap-1. В условиях окислительного стресса Nrf-2 высвобождается из комплекса с Keap-1 и активируется. При активации происходит его транслокация в ядро, где он инициирует транскрипцию генов *ARE* [39]. В предыдущей работе было сделано предположение, что мутации в Nrf-2 и Keap-1 при различных типах рака человека приводят к конститутивной активации Nrf-2 и экспрессии цитопротективных (способствующих выживанию) генов и в конечном итоге способствуют лекарственной устойчивости при раке [40].

Ранее было предположено, что активация ферментов NOX и Nrf-2 ассоциирована с поддержанием гомеостаза клеток [41]. Мутация в белке RAS усиливает экспрессию и активацию NOX и образования АФК в клетках рака толстой кишки [42, 43]. Чтобы сохранить окислительно-восстановительный баланс внутри клетки, му-

тированный белок RAS также способствует активации Nrf-2 [44]. Известно, что Nrf-2 участвует в регуляции образования АФК, опосредованной ферментами NOX [45]. Было также предположено, что активация NOX тесно связана с антиоксидантами, регулируемыми микроокружением опухоли [46]. Кроме того, во время прогрессирования различных типов рака происходит активация пути Nrf-2/HO-1, который активируется во время прогрессирования различных злокачественных новообразований, а также ассоциируется с химиорезистентностью и плохим прогнозом [26]. Была показана роль изоформ NOX в прогрессировании инвазии и росте опухоли. Однако их императивная роль в развитии лекарственной устойчивости клеток рака толстой кишки остается невыясненной.

В этом исследовании нам было интересно изучить роль Nrf-2 в развитии лекарственной устойчивости. Мы проверили, происходит ли активация Nrf-2 в резистентных клетках НСТ-

116/R или нет. В результате мы обнаружили, что в клетках НСТ-116/R наблюдается повышение экспрессии Nrf-2. Затем мы провели мониторинг активации Nrf-2-зависимого сигнального пути на основе его локализации и экспрессии его гена-мишени, *HO-1*. Мы обнаружили заметное накопление GFP-Nrf-2 в ядре и повышение экспрессии *HO-1* в клетках НСТ-116/R. Эти результаты позволяют предположить, что Nrf-2 не только стабилизируется в связи с повышенной генерацией АФК, но он также активируется и участвует в транскрипции генов-мишеней в клетках НСТ-116/R.

Внутриклеточный уровень АФК ассоциирован с различными событиями, происходящими внутри раковых клеток [27]. Все больше работ свидетельствуют о возможной связи между уровнем АФК внутри клеток и их устойчивостью к действию химических соединений [47]. В процессе образования АФК основное участие принимают ферменты семейства NOX. Поэтому

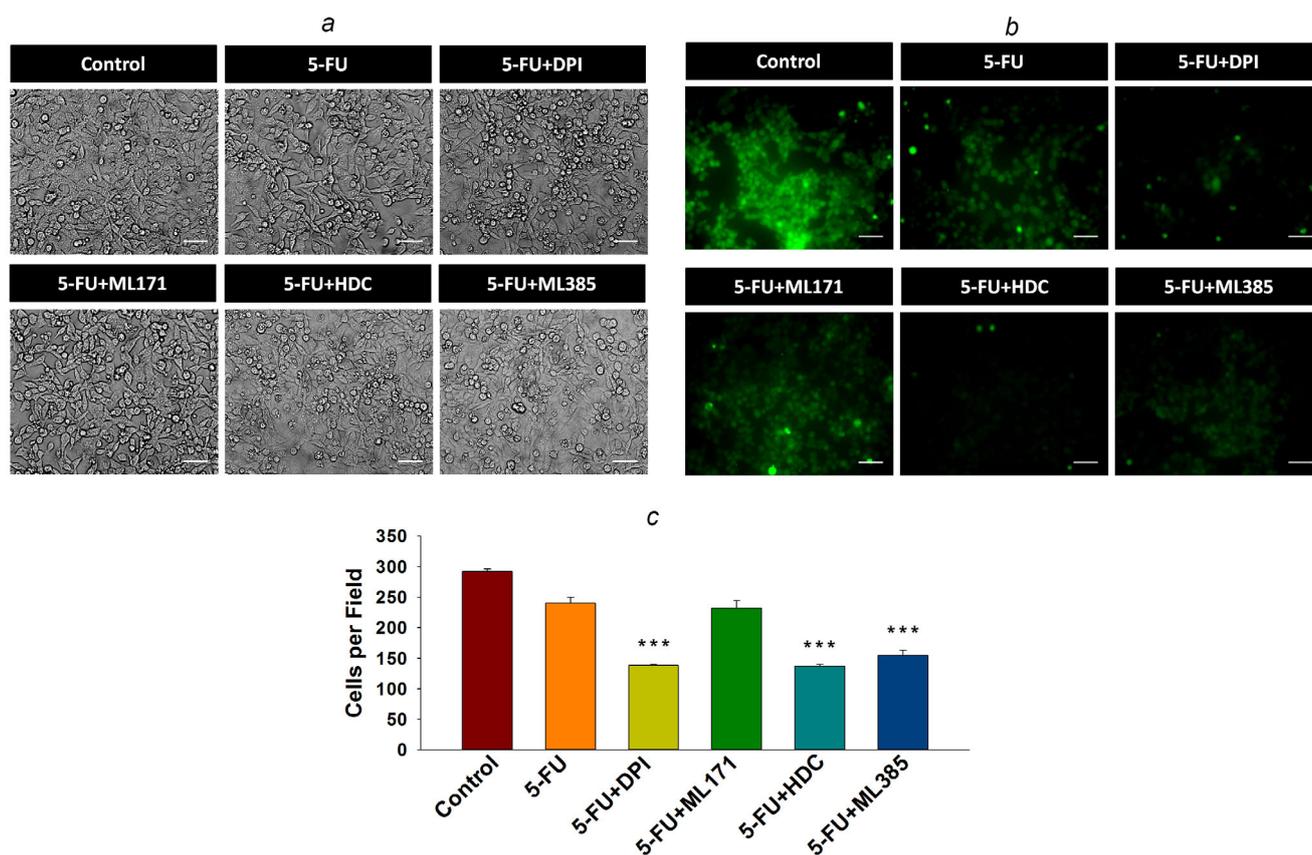


Рис. 6. Ингибирование процесса активации NOX-2 способствует апоптотической гибели клеток НСТ-116/R рака толстой кишки человека, устойчивых к действию лекарств. Клетки НСТ-116/R были обработаны только 5-FU (100 мкМ) или 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). *a* – Анализ морфологии клеток с использованием фильтра DIC. *b* и *c* – Анализ жизнеспособности клеток с помощью окрашивания красителем CFDA и использования флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 50 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как *** $p \leq 0,001$ между клетками, обработанными только 5-FU, и клетками, обработанными 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

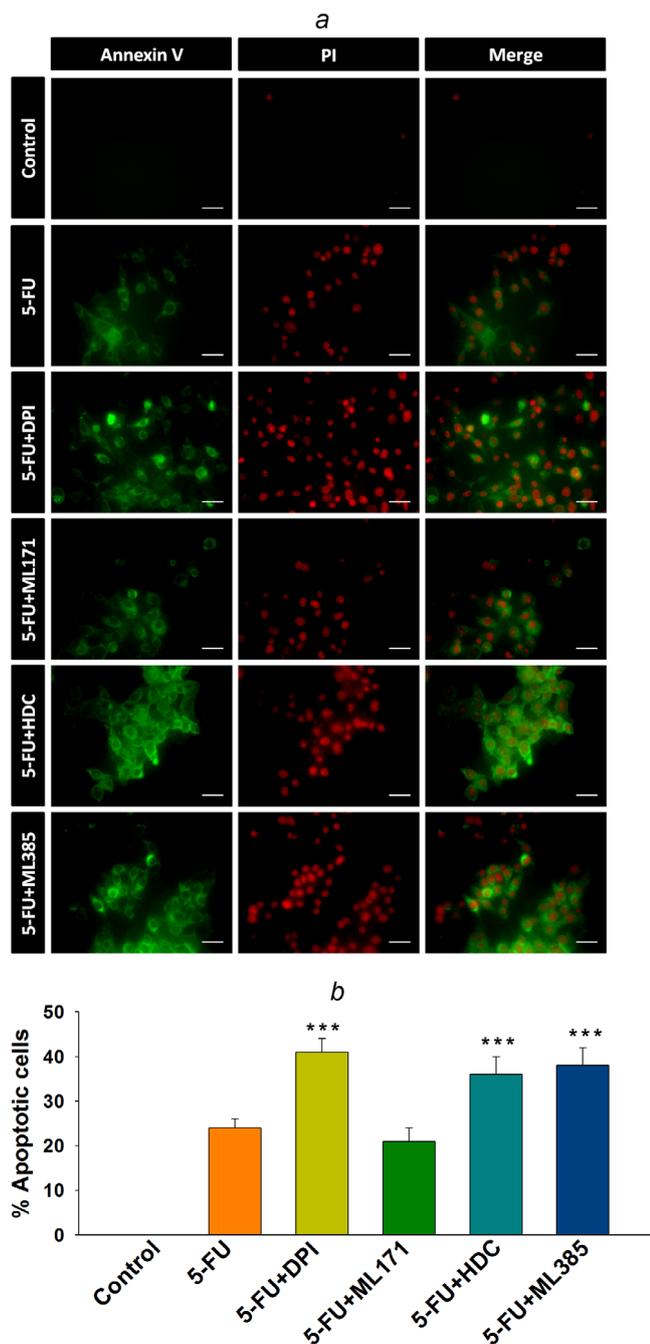


Рис. 7. Ингибирование процесса активации NOX-2 и Nrf-2 способствует гибели раковых клеток HCT-116/R в результате апоптоза. Клетки HCT-116/R были обработаны только 5-FU (100 мкМ) или же 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) или ML385 (10 мкМ). *a* и *b* – Анализ гибели клеток от апоптоза с помощью окрашивания Аннексином-V и PI и наблюдения клеток под флуоресцентным микроскопом. Масштабная линейка – 20 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как $***p \leq 0,001$ между клетками, обработанными только 5-FU, и клетками, обработанными 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

мы изучили возможную связь между активацией ферментов NOX и прогрессированием резистентных фенотипов. Нами было обнаружено, что в клетках HCT-116/R повышена активация NOX и усилена генерация АФК. Далее мы проверили экспрессию изоформ NOX-1 и NOX-2 и обнаружили, что в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R рака толстой кишки наблюдается повышение экспрессии только NOX-2, но не NOX-1, что предполагает изоформно-специфическую функцию фермента NOX. Кроме того, чтобы оценить связь с активацией NOX-2, мы использовали в своей работе специфические ингибиторы для NOX-1 (ML171) и NOX-2 (HDC) и обнаружили, что при обработке клеток DPI и HDC происходит ингибирование активности NOX. Тем не менее ингибирование активности NOX при обработке клеток ML171 было незначительным. В целом эти результаты позволяют предположить, что экспрессия и активация NOX-2 имеет отношение к развитию лекарственной устойчивости клеток HCT-116/R.

5-Фторурацил является широко используемым химиотерапевтическим агентом при лечении колоректального рака [32, 48]. Однако его химиопревентивная активность в клетках рака толстой кишки, устойчивых к действию лекарств, снижена [49]. Наши результаты показали, что при повышенной экспрессии гена *MDR1* клетки HCT-116/R очень устойчивы к воздействию 5-FU. Оказалось, что значение полумаксимальной концентрации 5-FU примерно в 2,9 раза выше в клетках HCT-116/R по сравнению с клетками HCT-116, что может быть результатом повышенной экспрессии P-гр (MDR-1). Недавние исследования показали, что опосредованные NOX окислительно-восстановительные изменения ускоряют химиорезистентность [50]. Более того, было показано, что в клетках рака толстой кишки, устойчивых к действию 5-фторурацила, Nrf-2 находится под эпигенетическим контролем [51]. Полученные нами данные согласуются с нашими предыдущими результатами, свидетельствующими о том, что в клетках HCT-116/R происходит активация как NOX, так и Nrf-2. Следовательно, нацеленное воздействие на NOX-2 и Nrf-2 может повысить чувствительность клеток HCT-116/R к воздействию 5-FU. Наши результаты говорят о том, что комбинация 5-FU с DPI (ингибитор ферментов NOX) и HDC (специфичный ингибитор NOX-2) способствует выраженной гибели клеток в результате апоптоза по сравнению с обработкой клеток HCT-116/R только одним 5-FU. Кроме того, комбинированная обработка клеток 5-FU и ML385 (специфичный ингибитор

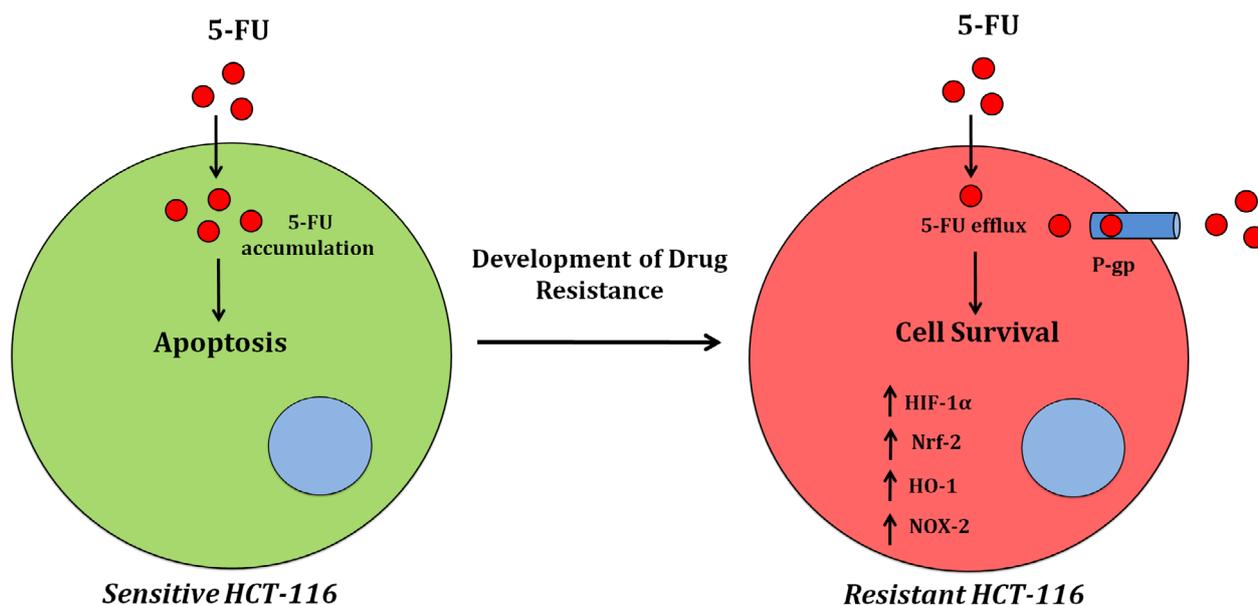


Рис. 8. Схематическое изображение изменений редокс-сигнальных путей при развитии устойчивых к действию 5-фторурацила фенотипов клеток (HCT-116) при раке толстой кишки человека

Nrf-2) приводила к аналогичным результатам. Однако при обработке клеток 5-FU вместе с ML171 (специфичный ингибитор NOX-1) не было обнаружено каких-либо заметных изменений, что указывает на важную роль белков NOX-2 и Nrf-2 в устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что MDR1 играет важную роль в развитии фенотипов лекарственной устойчивости раковых клеток. Мы также обнаружили значительное увеличение активности NOX и повышенную продукцию АФК в клетках HCT-116/R. Интересно, что в клетках HCT-116/R также было обнаружено существенное увеличение экспрессии и активности редокс-белков – NOX-2 и Nrf-2 (рис. 8). Кроме того, повышение экспрессии и активация NOX-2 и Nrf-2 способствовали возникновению устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила. Таким образом, гены резистентности к лекарствам способствуют репрограммированию редокс-гомеостаза внутри клеток путем активации NOX-2- и Nrf-2-зависимых сигнальных путей, кото-

рые могут быть в будущем использованы в качестве терапевтических мишеней для понижения устойчивости клеток рака толстой кишки к действию лекарств.

Благодарности. Авторы признательны SERB, Департаменту науки и технологий Нью-Дели Правительства Индии за предоставленный Ч. Патхаку исследовательский грант (EMR/2016/002574). Авторы благодарны ICMR Правительства Индии за предоставленную Ф.У. Вайдия научную стажировку и DST-INSPIRE за предоставленную Б. Н. Вагхела стажировку. Авторы благодарны Индийскому институту передовых исследований и фонду Пури за возможность получения образования в Индии, предоставление инфраструктуры и научно-исследовательского центра.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawla, P., Sunkara, T., and Barsouk, A. (2019) Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors, *Prz. Gastroenterol.*, **14**, 89.
2. Beheshti, M. (2018) Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. Research review, *Int. Pharm. Acta*, **1**, 88-89.
3. Longley, D., and Johnston, P. (2005) Molecular mechanisms of drug resistance, *J. Pathol.*, **205**, 275-292.
4. Tanguturi, P., Kim, K.-S., and Ramakrishna, S. (2020) The role of deubiquitinating enzymes in cancer drug resistance, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **85**, 627-639.

5. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., and Baradaran, B. (2017) The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review, *Adv. Pharm. Bull.*, **7**, 339.
6. Choi, Y. H., and Yu, A. M. (2014) ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development, *Curr. Pharm. Des.*, **20**, 793-807.
7. Locher, K. P., and Borths, E. (2004) ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF, *FEBS Lett.*, **564**, 264-268.
8. Holland, I. B. (2011) ABC transporters, mechanisms and biology: an overview, *Essays Biochem.*, **50**, 1-17.
9. Gottesman, M. M., and Pastan, I. H. (2015) The role of multidrug resistance efflux pumps in cancer: revisiting a JNCI publication exploring expression of the *MDR1* (P-glycoprotein) gene, *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**, djv222, doi: 10.1093/jnci/djv222.
10. Gottesman, M. M., Fojo, T., and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48-58.
11. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., et al. (2019) ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 6175804, doi: 10.1155/2019/6175804.
12. Maryanovich, M., and Gross, A. (2013) A ROS rheostat for cell fate regulation, *Trends Cell Biol.*, **23**, 129-134.
13. Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.*, **24**, R453-R462.
14. Crane, F., and Low, H. (2008) Reactive oxygen species generation at the plasma membrane for antibody control, *Autoimmun. Rev.*, **7**, 518-522.
15. Krause, K.-H. (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **57**, S28-S29.
16. Weyemi, U., Redon, C. E., Parekh, P. R., Dupuy, C., and Bonner, W. M. (2013) NADPH oxidases NOXs and DUOXs as putative targets for cancer therapy, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13**, 502-514.
17. Juhasz, A., Markel, S., Gaur, S., Liu, H., Lu, J., et al. (2017) NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **292**, 7866-7887.
18. Banskota, S., Regmi, S. C., and Kim, J.-A. (2015) NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7, *Mol. Cancer*, **14**, 123.
19. Jaramillo, M. C., and Zhang, D. D. (2013) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer, *Genes Dev.*, **27**, 2179-2191.
20. Kessel, D., Beck, W. T., Kukuruga, D., and Schulz, V. (1991) Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes, *Cancer Res.*, **51**, 4665-4670.
21. Shen, F., Chu, S., Bence, A. K., Bailey, B., Xue, X., et al. (2008) Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 95-102.
22. Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., et al. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation, *Biochem J.*, **406**, 105-114.
23. Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., and Pathak, C. (2015) Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells, *PLoS One*, **10**, e0117526.
24. Vaidya, F. U., Sharma, R., Shaikh, S., Ray, D., Aswal, V. K., and Pathak, C. (2019) Pluronic micelles encapsulated curcumin manifests apoptotic cell death and inhibits pro-inflammatory cytokines in human breast adenocarcinoma cells, *Cancer Rep.*, **2**, e1133.
25. Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1727-1745.
26. Furfaro, A., Traverso, N., Domenicotti, C., Piras, S., Moretta, L., et al. (2016) The Nrf2/HO-1 axis in cancer cell growth and chemoresistance, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 1958174, doi: 10.1155/2016/1958174.
27. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., et al. (2019) Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements, *Biomolecules*, **9**, 735.
28. Wang, X., Son, Y.-O., Chang, Q., Sun, L., Hitron, J. A., et al. (2011) NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium, *Toxicol. Sci.*, **123**, 399-410.
29. Das, D., Preet, R., Mohapatra, P., Satapathy, S. R., Siddharth, S., et al. (2014) 5-Fluorouracil mediated anti-cancer activity in colon cancer cells is through the induction of adenomatous polyposis *Coli*: implication of the long-patch base excision repair pathway, *DNA Rep.*, **24**, 15-25.
30. Grem, J. L. (2000) 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development, *Invest. New Drugs*, **18**, 299-313.
31. Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., and Chen, W.-S. (2008) 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies, *Molecules*, **13**, 1551-1569.
32. Pardini, B., Kumar, R., Naccarati, A., Novotny, J., Prasad, R. B., Forsti, A., et al. (2011) 5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **72**, 162.
33. Kovalev, A. A., Tsvetaeva, D. A., and Grudinskaja, T. V. (2013) Role of ABC-cassette transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in the development of primary and acquired multiple drug resistance in patients with early and metastatic breast cancer, *Exp. Oncol.*, **35**, 287-290.
34. Van der Jeught, K., Xu, H.-C., Li, Y.-J., Lu, X.-B., and Ji, G. (2018) Drug resistance and new therapies in colorectal cancer, *World J. Gastroenterol.*, **24**, 3834.
35. Liu, Y., Li, Q., Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., et al. (2016) Cancer drug resistance: redox resetting renders a way, *Oncotarget*, **7**, 42740.
36. Kamata, T. (2009) Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development, *Cancer Sci.*, **100**, 1382-1388.
37. Adachi, Y., Shibai, Y., Mitsushita, J., Shang, W., Hirose, K., and Kamata, T. (2008) Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6, *Oncogene*, **27**, 4921-4932.
38. Martner, A., Aydin, E., and Hellstrand, K. (2019) NOX2 in autoimmunity, tumor growth and metastasis, *J. Pathol.*, **247**, 151-154.
39. Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution, *Genes Cells*, **16**, 123-140.
40. Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., et al. (2008) Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer, *Gastroenterology*, **135**, 1358-1368.e1354.
41. Sekhar, K. R., Crooks, P. A., Sonar, V. N., Friedman, D. B., Chan, J. Y., et al. (2003) NADPH oxidase activity is essential for Keap1/Nrf2-mediated induction of GCLC in response to 2-indol-3-yl-methylenequinclidin-3-ols, *Cancer Res.*, **63**, 5636-5645.

42. Wu, R. F., and Terada, L. S. (2009) Ras and Nox: linked signaling networks? *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1276-1281.
43. Laurent, E., McCoy, J. W. 3rd, Macina, R. A., Liu, W., Cheng, G., et al. (2008) Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras, *Int. J. Cancer*, **123**, 100-107.
44. Tao, S., Wang, S., Moghaddam, S. J., Ooi, A., Chapman, E., et al. (2014) Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2, *Cancer Res.*, **74**, 7430-7441.
45. Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 794-801.
46. Han, M., Zhang, T., Yang, L., Wang, Z., Ruan, J., and Chang, X. (2016) Association between NADPH oxidase (NOX) and lung cancer: a systematic review and meta-analysis, *J. Thorac. Dis.*, **8**, 1704.
47. Parekh, A., Das, S., Parida, S., Das, C. K., Dutta, D., et al. (2018) Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene*, **37**, 4546-4561.
48. Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 330-338.
49. He, L., Zhu, H., Zhou, S., Wu, T., Wu, H., et al. (2018) Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-12.
50. Kim, E.-K., Jang, M., Song, M.-J., Kim, D., Kim, Y., and Jang, H. H. (2019) Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells, *Antioxidants*, **8**, 471.
51. Kang, K., Piao, M., Kim, K., Kang, H., Chang, W., et al. (2014) Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: involvement of TET-dependent DNA demethylation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1183-e1183.

UPREGULATION OF NOX-2 AND Nrf-2 PROMOTES 5-FLUOROURACIL-RESISTANCE OF HUMAN COLON CARCINOMA (HCT-116) CELLS*

Bh. N. Waghela¹, F. U. Vaidya¹, and Ch. Pathak^{1,2**}

¹ School of Biological Sciences & Biotechnology, Indian Institute of Advanced Research, Koba Institutional Area, 382426 Gandhinagar, India; E-mail: cmpathak@iiar.res.in

² Amity Institute of Biotechnology, Amity University, 122413 Gurgaon, India

Altered expression of cellular redox genes and proteins contributes to invasion, metastasis, and drug resistance in cancer. NADPH oxidase (NOX) isoforms are the pro-oxidant enzymes that generate ROS as a primary product. Dysregulation of NOX activity and expression alters ROS generation, which either directly or indirectly modulates cell death and survival signaling during the progression of cancer. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) is an inducible transcription factor, which transcribes an array of antioxidant genes and protects cancer cells from the oxidative stress. Both NOXs and Nrf-2 participate in the regulation of cellular redox homeostasis; but their dysregulation promotes oxidative stress, which contributes to the progression of different types of cancer. Indeed, the role of NOX isoforms and Nrf-2 in developing the drug resistance in cancer is largely unknown. In the present study, we have explored the association of NOX isoforms and Nrf-2 signaling with the *MDR1* gene expression in colon carcinoma cells (HCT-116/R). The *MDR1* gene was overexpressed to develop resistant HCT-116/R cells and the NOX activation and ROS generation were monitored. We also assessed the role of NOX isoforms and Nrf-2 in the 5-fluorouracil (5-FU) mediated apoptotic cell death of HCT-116/R cells. The HCT-116/R cells demonstrated higher expression of HIF-1 α , Nrf-2, and HO-1 and were highly resistant to 5-FU; they also displayed upregulated expression and activity of NOX-2, as well as elevated ROS levels. Interestingly, the treatment with HDC, a specific NOX-2 inhibitor, reduced the ROS levels in HCT-116/R cells. The treatment with HDC and ML-385 (specific inhibitor of Nrf-2) augmented the 5-FU-mediated apoptotic cell death of HCT-116/R cells, which suggests that NOX-2 and Nrf-2 are involved in the development of the chemoresistant phenotype of these cells. Taken together, NOX-2 and Nrf-2 are associated with developing drug resistance of colorectal cancer cells and might be potential targets to overcome drug resistance during cancer therapy.

Keywords: 5-fluorouracil, drug resistance, HO-1, MDR1, NOX-2, Nrf-2, ROS