

УДК 577.152.1:576.385.5:616-001.8

ИЗМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВОЙ ЛИНИИ P19 ПРИ ГИПОКСИИ

Орлов Д.С.¹, Рязанцева Н.В.^{2,3}, Степовая Е.А.¹, Носарева О.Л.¹, Шахристова Е.В.¹, Иванов В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

³ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

РЕЗЮМЕ

Введение. Согласно современным представлениям, опухолевый рост, наряду с формированием окислительного стресса, сопровождается гипоксией. В настоящее время актуальным является изучение регуляции функционирования молекулярных систем клеток с помощью конформационных изменений белков.

Цель исследования – оценить состояние системы глутатиона и уровень глутатионирования белков в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии.

Материал и методы. Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши), культивированные в условиях нормоксии и гипоксии. Методом спектрофотометрии определяли концентрацию общего, окисленного, восстановленного и белково-связанного глутатиона, величину соотношения восстановленной фракции тиола к окисленной, а также активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Результаты. Дисбаланс системы глутатиона сопровождался снижением редокс-статуса опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии на фоне увеличения содержания белково-связанного глутатиона.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено формирование окислительного стресса при моделировании гипоксии в опухолевых клетках линии P19. Увеличение содержания белково-связанного глутатиона может свидетельствовать об участии процесса глутатионирования протеинов в регуляции метаболизма и функций опухолевых клеток линии P19 при гипоксии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глутатион, гипоксия, окислительный стресс, опухолевый рост.

Введение

В настоящее время известно, что ряд патологических состояний, в том числе опухолевый рост, сопровождается гипоксией, наработкой активных форм кислорода (АФК), нарушением редокс-баланса клетки с последующим развитием окислительного стресса. АФК могут выступать в роли повреждающих агентов любых макромолекул клетки. Среди многообразия механизмов действия АФК на протеины можно выделить два основных: взаимодействие с металлосодер-

жащими белками либо окисление их SH-групп. В последнее время активно рассматривается роль окисления сульфгидрильных групп в эволюционно-консервативных доменах регуляторных молекул как одного из способов регуляции их активности [1, 2].

Актуальным направлением медико-биологической науки является изучение регуляции функционирования молекулярных систем при типовых патологических процессах, в частности гипоксии, в результате конформационных изменений белковых молекул.

Основным акцептором АФК, кофактором ряда ферментов антиоксидантной и детоксикационной систем [3, 4], выступает глутатион, который участвует в экспрессии редокс-чувствительных генов, регуляции

✉ Носарева Ольга Леонидовна, тел. 8-923-411-1951;
e-mail: olnosareva@yandex.ru

внутриклеточной сигнализации, в частности посредством глутатионилирования белков [1, 5].

Компоненты системы глутатиона обеспечивают процесс S-тиоляции/детиоляции активных центров протеинов, защищая их от необратимой окислительной модификации и инактивации [2, 4, 5], что способствует регуляции и поддержанию функциональной активности клеток при гипоксии.

Цель исследования – оценить состояние системы глутатиона и уровень глутатионилирования белков в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии.

Материал и методы

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Культивирование опухолевых клеток проводили адгезионным методом в полной питательной среде α -MEM («БиолоТ», Россия), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия), L-глутамин (0,3 мг/мл) («БиолоТ», Россия) и гентамицин (100 мкг/мл) («Микроген», Россия) в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,5%-го раствора трипанового синего (DIA.M, Германия). Для постановки эксперимента использовались культуры клеток, содержащие не более 5% погибших клеток. Моделирование гипоксии проводили с помощью газовой смеси (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) в камере Nurxoxia Incubator Chamber (Stemcell, Канада).

Содержание общего, восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) глутатиона и величины отношения восстановленной формы трипептида к окисленной определяли методом, предложенным М.Е. Anderson (1985) в модификации I. Rahman и соавт. (2006) [6]. Результаты представляли в наномолях на 1 мг белка. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) оценивали по NADPH-зависимому восстановлению GSSG с дальнейшим его взаимодействием с 5,5-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой, приводящему к образованию тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [7]. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) определяли по способности катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидропероксидом т-бутила [8]. Результаты активности изучаемых ферментов выражали в микромолях в минуту на 1 мг белка. Определяли содержание SH-групп белков и белково-связанного глутатиона методом, предложенным В.Р. Burchill и соавт. [9], учитывая способность 1%-го

боргидрида натрия высвобождать GSH из связи с белками. Результаты представляли в наномолях на 1 мг белка. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аминокислот лизина и аргинина белковых молекул [10].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы SPSS 17.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили при помощи критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы *Me*, верхнего и нижнего квартилей (Q_1 – Q_3). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ [11].

Результаты и обсуждение

Одним из основных компонентов поддержания редокс-статуса клеток и составляющей антиоксидантной защиты является система глутатиона. Для определения ее роли в поддержании редокс-статуса в условиях гипоксии опухолевой линии P19 в исследовании было проведено определение концентраций фракций этого тиола. Нами получено статистически значимое уменьшение содержания общего глутатиона (в 1,2 раза, $p < 0,05$) за счет снижения фракции восстановленной формы тиола (в 1,3 раза, $p < 0,05$) в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии по сравнению с клетками, культивированными в условиях нормоксии (таблица).

Показатели системы глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при культивировании в условиях нормоксии и гипоксии (*Me* (Q_1 – Q_3))

Показатель	Нормоксия	Гипоксия
Общий глутатион, нмоль/мг белка	5,97 (5,80–6,31)	4,86 (4,74–5,03) *
Окисленный глутатион, нмоль/мг белка	0,31 (0,30–0,41)	0,43 (0,39–0,45)
Восстановленный глутатион, нмоль/мг белка	5,66 (5,55–5,91)	4,47 (4,40–4,58) *
GSH/GSSG, усл. ед.	18,44 (13,15–20,29)	10,19 (9,88–11,35) *
Белково-связанный глутатион, нмоль/мг белка	0,60 (0,58–0,74)	2,08 (1,95–2,19) *
Глутатионпероксидаза, мкмоль/(мин · мг белка)	1,34 (1,25–1,40)	1,01 (0,95–1,03) *
Глутатионредуктаза, мкмоль/(мин · мг белка)	3,57 (3,33–3,90)	6,08 (5,62–10,20) *

* $p < 0,05$ – уровень значимости различий по сравнению с опухолевыми клетками линии P19, культивированными в условиях нормоксии.

Соотношение концентраций восстановленных и окисленных тиоловых групп в клетке определяет ее редокс-статус. На формирование окислительного стресса в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии указывает статистически значимое снижение величины соотношения GSH/GSSG (в 1,8 раза, $p < 0,05$) по сравнению с клетками культивированными в условиях нормоксии (таблица). Фракция окисленного глутатиона имела сопоставимые значения в изучаемых клетках при гипоксии и нормоксии. Данный факт доказывает его активное использование опухолевыми клетками линии P19 при гипоксии в процессе глутатионилирования белков ввиду высокой реакционной способности окисленного глутатиона по отношению к SH-группам протеинов. Установлено статистически значимое увеличение содержания белково-связанного глутатиона в клетках при гипоксии (в 3,5 раза, $p < 0,05$) по сравнению с клетками, культивированными в условиях нормоксии (таблица). Таким образом, в поддержание редокс-гомеостаза активно вовлекаются, помимо глутатиона, и SH-группы внутриклеточных белков.

В последнее время тиолсодержащие сенсоры рассматриваются в качестве редокс-сигнальных модулей [12]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что высокие скорости взаимодействия сенсорных молекул с АФК обеспечиваются наличием сайтов связывания, которые содержат функционально-активный остаток молекулы, способный прямо реагировать с окисляющим агентом. В белках эту роль в редокс-сигнализации выполняют цистеиновые остатки (Cys-SH). При взаимодействии с активированными кислородными метаболитами они могут подвергаться окислению в цистеинсульфеновую (Cys-SOH), цистеинсульфиновую (Cys-SO₂H) и цистеинсульфоновую (Cys-SO₃H) кислоту, тем самым выполняя важную роль в клеточной сигнализации путем изменения конформации и активности белков [13]. Редокс-статус тиоловых групп в составе молекул белков в клетках играет важную роль в их фолдинге и поддержании структуры, а глутатион является одним из важнейших низкомолекулярных редокс-регуляторов.

На формирование окислительного стресса в условиях гипоксии также указывал дисбаланс ферментов системы глутатиона. Установлено статистически значимое увеличение активности глутатионредуктазы (в 1,7 раза, $p < 0,05$) и снижение глутатионпероксидазы (в 1,3 раза, $p < 0,05$) по сравнению с клетками культивированными в условиях нормоксии (см. таблицу).

В условиях сформированного окислительного стресса при гипоксии в опухолевых клетках линии

P19 белковые молекулы, в том числе ферменты, являются мишенью для атаки свободными радикалами, что влечет за собой изменение пространственной конформации и снижение функциональной активности глутатионпероксидазы. Увеличение активности глутатионредуктазы обеспечивало адекватное восстановление окисленного глутатиона и использование клетками для поддержания редокс-баланса в условиях гипоксии.

Заключение

Таким образом, компоненты системы глутатиона необходимы для обеспечения редокс-баланса, регуляции метаболизма и функций опухолевых клеток, что может быть использовано для расширения представлений о молекулярных механизмах управления апоптотической гибелью в условиях гипоксии.

Современная концепция устойчивости опухолевых клеток к запрограммированной гибели базируется на их способности успешно существовать в условиях окислительного стресса.

Применение моделирования гипоксических условий в сочетании с редокс-модуляцией статуса опухолевых клеток линии P19 в качестве индукторов апоптоза может быть перспективным направлением таргетной терапии онкологических заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда в рамках научного проекта № 15-36-01289.

Литература

1. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции // Биомедицинская химия. 2010. № 56 (6). С. 657–662.
2. Adimora N.J., Jones D.P., Kemp M.L. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses // Antioxid Redox Signal. 2010. № 13 (6). P. 731–743.
3. Zhu Y., Carvey P.M., Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide // Neurochemistry International. 2007. № 50 (4). P. 671–680.
4. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. № 72 (2). С. 158–174.
5. Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Петина Г.В. и др. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе // Бюл. СО РАМН. 2010. № 30 (5). С. 64–69.
6. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // Journal of Radiation Research. 2004. № 45 (1). P. 33–39.
7. Worthington D.J., Rosemeyer M.A. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation // European Journal of Biochemistry. 1976. № 67.

- Р. 231–238.
8. *Медицинские лабораторные технологии*: в 2 т. / под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1998. Т. 2. 656 с.
9. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B. et al. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // *Journal of Cell Biology*. 1978. № 76 (2). P. 439–447.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. № 7 (1). P. 248–254.
11. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика, 1999. 459 с.
12. Toledano M.B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules // *Trends in Biochemical Sciences*. 2004. № 29 (7). P. 351–357.
13. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // *Кислород и антиоксиданты*. 2009. № 1. С. 3–64.

Поступила в редакцию 15.06.2015 г.

Утверждена к печати 02.07.2015 г.

Орлов Дмитрий Сергеевич – аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Рязанцева Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета; профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

Степовая Елена Алексеевна – д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Носарева Ольга Леонидовна (✉) – канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Шахристова Евгения Викторовна – канд. мед. наук, руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

✉ **Носарева Ольга Леонидовна**, тел. 8-923-411-1951; e-mail: olnosareva@yandex.ru

CHANGES IN THE GLUTATHIONE SYSTEM IN P19 EMBRYONAL CARCINOMA CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS

Orlov D.S.¹, Ryazantseva N.V.^{2,3}, Stepovaya Ye.A.¹, Nosareva O.L.¹, Shakhristova Ye.V.¹, Ivanov V.V.¹

1 Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

2 Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

3 Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. According to modern perceptions, tumor growth, along with oxidative stress formation, is accompanied by hypoxia. Nowadays studying the regulation of cellular molecular system functioning by conformational changes in proteins appears to be a topical issue.

Research goal was to evaluate the state of the glutathione system and the level of protein glutathionylation in P19 embryonal carcinoma (EC) cells under hypoxic conditions.

Material and methods. P19 EC cells (mouse embryonal carcinoma) cultured under normoxic and hypoxic conditions served the research material.

The concentration of total, oxidized, reduced and protein-bound glutathione, the reduced to oxidized thiol ratio as well as glutathione peroxidase and glutathione reductase activity were determined by spectrophotometry.

Results. Glutathione imbalance was accompanied by a decrease in P19 EC cell redox status under hypoxic conditions against the backdrop of a rise in protein-bound glutathione.

Conclusions. As a result of the conducted study oxidative stress formation was identified when modeling

hypoxia in P19 embryonal carcinoma cells. The rise in the concentration of protein-bound glutathione may indicate the role of protein glutathionylation in regulation of P19 cell metabolism and functions under hypoxia.

KEY WORDS: glutathione, hypoxia, oxidative stress, tumor growth.

Bulletin of Siberian Medicine, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 41–45

References

1. Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. Glutation yadra kletki i ego funktsii [The nuclear glutathione and its functions]. *Biomeditsinskaya khimiya – Biomedical Chemistry*, 2010, no. 56 (6), pp. 657–662 (in Russian).
2. Adimora N.J., Jones D.P., Kemp M.L. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid Redox Signal*, 2010, no. 13 (6), pp. 731–743.
3. Zhu Y., Carvey P.M., Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. *Neurochemistry international*, 2007, no. 50(4), pp. 671–680.
4. Oktyabr'skiy O.N., Smirnova G.V. Redoks-regulyatsiya kletochnykh funktsiy [Redox regulation of cellular functions]. *Biokhimiya – Biochemistry*, 2007, no. 72 (2), pp. 158–174 (in Russian).
5. Stepovaya Ye.A., Zhavoronok T.V., Petina G.V. et al. Uchastie tioldisul'fidnoy sistemy v regulyatsii okislitel'noy modifikatsii belkov v neytrofilakh pri okislitel'nom stresse [Thioldisulphide system participation in protein oxidative modification regulation in neutrophils during oxidative stress]. *Byulleten' SO RAMN – Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical*, 2010, no. 30 (5), pp. 64–69 (in Russian).
6. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *Journal of Radiation Research*, 2004, no. 45 (1), pp. 33–39.
7. Worthington D.J., Rosemeyer M.A. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *European Journal of Biochemistry*, 1976, no. 67, pp. 231–238.
8. *Meditsinskie laboratornye tekhnologii: v 2 t.* [Medical laboratory technologies: in 2 Volumes] Ed. by A.I. Karpishchenko. St-Petersburg, Intermedika Publ., 1998, vol. 2. 656 p. (in Russian).
9. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B. et al. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cell Biology*, 1978, no. 76 (2), pp. 439–447.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, no. 7 (1), pp. 48–54.
11. Glanc S. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Medicobiological statistics]. Moscow, Practice Publ., 1999. 459 p. (in Russian).
12. Toledano M.B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, no. 29 (7), pp. 351–357.
13. Zenkov N.K., Men'shchikova Ye.B., Tkachev V.O. Nekotorye printsipy i mekhanizmy redoks-regulyatsii [Some of the principles and mechanisms of redox regulation]. *Kislород i antioksidanty – Oxygen and Antioxidants*, 2009, no. 1, pp. 3–64 (in Russian).

Orlov Dmitry S. (✉), Siberian State Medical University, Russian Federation.

Ryazantseva Natalia V., Siberian Federal University, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Stepovaya Yelena A., Siberian State Medical University, Russian Federation.

Nosareva Olga L., Siberian State Medical University, Russian Federation.

Shakhristova Yevgenia V., Siberian State Medical University, Russian Federation.

Ivanov Vladimir V., Siberian State Medical University, Russian Federation.

✉ **Nosareva Olga L.**, Ph. +7-923-411-1951; e-mail: olnosareva@yandex.ru