

УДК 577.346

ГЕЛДАНАМИЦИН УСИЛИВАЕТ РАДИОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 В ОБЛУЧЕННЫХ ЗТЗ ФИБРОБЛАСТАХ

© 2022 г. Е. Г. Новосёлова^{1,*}, О. В. Глушкова¹, М. Г. Шарапов¹, М. О. Хренов¹, С. Б. Парфенюк¹, С. М. Лунин¹, Т. В. Новосёлова¹, Э. К. Мубаракшина¹, Р. Н. Гончаров¹, член-корреспондент РАН Е. Е. Фесенко¹

Поступило 05.05.2022 г.
После доработки 26.06.2022 г.
Принято к публикации 28.06.2022 г.

Целью исследования была оценка возможности повышения радиозащитного потенциала перокси-редоксина 6 (Prdx6) и его мутантной формы S32A путем их совместного использования с гелданамицином (GA) для фибробластов ЗТЗ, облученных рентгеновским излучением с дозой 6 Гр.

Мутантный фермент S32A, не обладающий фосфолипазной активностью, при его сочетанном применении с GA проявляет более выраженную радиозащитную активность. Использование такой комбинации противолучевых препаратов полностью снимает пик активности NF-κB в облученных ЗТЗ клетках. Другой фактор транскрипции, p53, являющийся показателем уровня апоптоза клетки и увеличивающийся при облучении, также снижается под действием S32A в сочетании с GA. Низкомолекулярный белок p21, являющийся маркером сенесценции клеток, продукция которого возрастает при облучении, также нормализуется при использовании S32A в сочетании с GA. Кроме того, использование этой комбинации радиозащитных препаратов заметно снижает стрессовый ответ клеток ЗТЗ на рентгеновское облучение.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, фибробласты ЗТЗ, апоптоз, клеточный стресс, сенесценция, пероксиредоксин 6, гелданамицин

DOI: 10.31857/S2686738922050213

Известно, что в клетках, выживших после рентгеновского облучения, обычно наблюдаются изменения уровней экспрессии генов, связанных с репарацией ДНК, клеточным циклом, воспалением и иммунным ответом [1]. Ранее было установлено, что ионизирующая радиация (IR) является причиной клеточного стресса и нарушения активности клеток, вызываемой либо путем прямого повреждения ДНК, либо непрямого воздействия на ДНК через образование активных форм кислорода (ROS) [2]. По этой причине в течение многих лет проводятся исследования, направленные на поиск новых радиозащитных препаратов. Недавно мы показали, что фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6 (Prdx6) увеличивает выживаемость облученных ЗТЗ фибробластов, стимулирует их пролиферацию, подавляет апоптоз,

некроз и сенесценцию этих клеток, вызванных сублетальной дозой рентгеновского облучения [3]. На основании наших исследований был сделан вывод о целесообразности исследования разных форм пероксиредоксина 6 в качестве радиопротекторных агентов.

Целью настоящей работы было изучение возможности усиления радиозащитного действия белка Prdx6 и его мутантной формы S32A путем их использования совместно с известным блокаторм белка теплового шока HSP90, гелданамицином (GA), обладающим радиозащитным и сенолитическим действием [4, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали линию ЗТЗ фибробластов мыши из 5–10 пассажей и две формы пероксиредоксина 6: нормальный Prdx6, обладающий пероксидазной и фосфолипазной активностями, а также белок с мутацией (S32A) в фосфолипазном активном центре, обладающий только пероксидазной активностью. Мутагенез гена PRDX6 проводили по методике перекрывающихся праймеров, с использованием высокоточной

¹ Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., Россия
*e-mail: elenapov_06@mail.ru

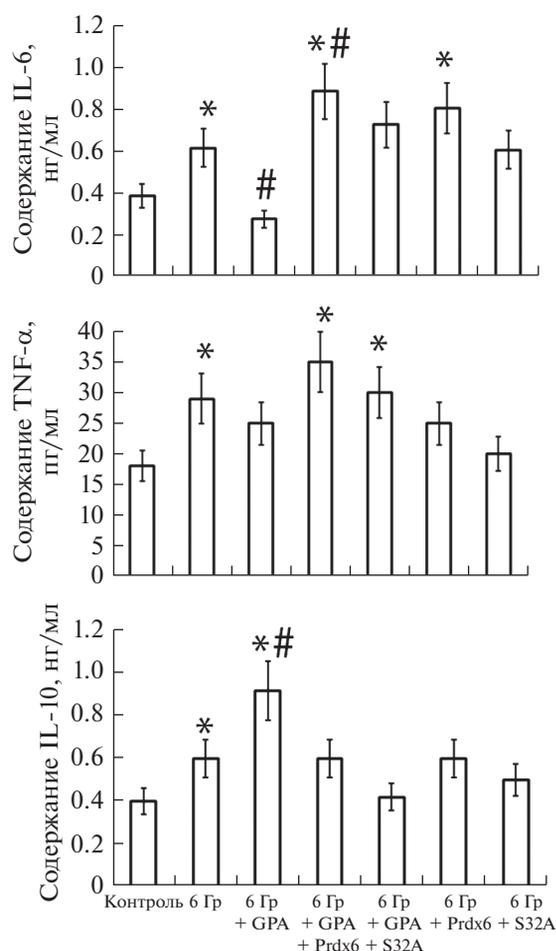


Рис. 1. Продукция цитокинов в 3Т3 фибробластах после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр и использования радиозащитных препаратов. Использовали первичные кроличьи антитела к IL-6, TNF- α и IL-10 компании Rnprotech (USA). В качестве вторичных использовали козы антитела к Ig G кролика компании Имтек (Россия). Каждое значение – среднее от 3 независимых экспериментов с использованием в каждом случае клеток из разных пассажей. * – достоверное отличие от контроля; # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

ДНК полимеразы Tersus (Евроген, Россия), праймеров несущих точечную замену (S32A-F 5'-CTGGGAGACGCATGGGGCAT-3'; S32A-R 5'-ATGCCCATGCGTCTCCAG-3') и фланкирующих праймеров (Prx6-F 5'-TTTTTCATATGCCCCGAGGTCTGCTT-3'(NdeI), Prx6-R 5'-AATTCTC-GAGAGGCTGGGGTGTGTA-3'(XhoI)). Условия ПЦР и этапы клонирования в вектор pET23b были подробно описаны ранее на примере другого мутанта Prdx6 [6]. Конструкцию, кодирующую мутантную форму Prdx6-S32A, проверяли секвенированием по Сэнгеру, с помощью компании Евроген.

Важно отметить, что Prdx6 и его мутантная форма S32A и ингибитор стрессового белка, GA,

добавлялись к 3Т3 клеткам через 4 ч после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр. После этих процедур клетки культивировали в течение 5 сут. Уровни цитокинов определяли с использованием иммуноферментного анализа, количество других белков оценивали, применяя вестерн блот анализ, как было описано ранее [3].

В работе проводили комплексное исследование клеточных ответов на радиационные повреждения, связанные с изменением неспецифического иммунитета, с процессами репарации, с апоптозом и старением (сенесценцией) клеток, с уровнем стрессового ответа 3Т3 фибробластов. Подобно другим стрессорам, ионизирующее излучение усиливало синтез различных иммуностимулирующих и модулирующих молекул, таких как белки теплового шока (HSP), цитокины, факторы транскрипции (p53, NF- κ B), что было показано авторами с использованием облученных 3Т3 клеток [3].

В настоящей работе, оценивая эффекты облучения на показатели иммунного статуса 3Т3 клеток, мы показали, что рентгеновское облучение в дозе 6 Гр вызывает повышение продукции провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α и противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 1).

Интересно, что добавление к клеткам ингибитора белка теплового шока HSP90 также снижало продукцию IL-6, но не IL-10. Результаты показали, что мутантный фермент-антиоксидант, не обладающий фосфолипазной активностью (S32A), в отношении продукции провоспалительных цитокинов проявляет наиболее выраженную радиозащитную активность, особенно при его сочетании с GA.

Для исследования механизмов влияния рекомбинантных белков на основе Prdx6 и ингибитора HSP90 на облученные 3Т3 клетки мы изучали ключевые звенья регуляции клеточных процессов. Среди этих звеньев ядерный фактор транскрипции каппа В (NF- κ B) признан ключевым фактором регуляции активности клеточного метаболизма для большинства типов клеток, при этом NF- κ B является центральным фактором транскрипции в иммунной системе и регулирует выживание клеток. Более того, индукция радиорезистентности опосредуется несколькими генами, которые регулируются NF- κ B [7]. Было показано, что в облученных клетках уровень фосфорилирования NF- κ B по Ser 536 достоверно увеличивается, а использование Prdx6 и его мутантной формы S32A в сочетании с GA полностью снимает пик активности NF- κ B в облученных 3Т3 клетках, при этом более эффективной оказалась мутантная форма S32A (рис. 2). Выживаемость облученных 3Т3 клеток определяли с использованием Crystal Violet, как было описано ранее [3]. Показали, что добавление Prdx6 и осо-

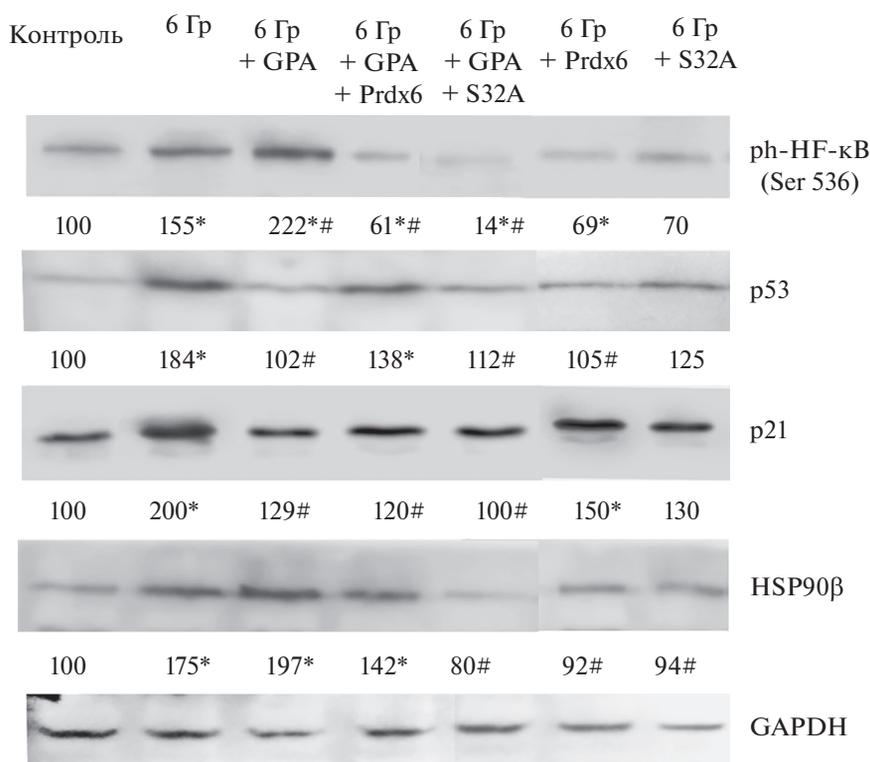


Рис. 2. Продукция сигнальных и стрессовых белков в 3Т3 фибробластах после облучения в дозе 6 Гр и использования радиозащитных препаратов. Для определения всех белков использовали наборы компании CellSignalling (USA). Показаны фотографии Вестерн блот анализа для одного из 3 независимых экспериментов, цифры под полосками – среднее значение количества белка после денситометрии блотов от трех экспериментов, показатели нормировали к соответствующему контролю нагрузки (GAPDH) и выражали в относительных единицах. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. *Достоверное отличие от контроля; # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

бенно его мутантной формы S32A увеличивает процент выживших клеток, при этом защита белками-антиоксидантами не возрастает в присутствии GA (табл. 1).

Известно, что p53 играет важную роль в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза [8]. По этой причине оценивали в 3Т3 клетках продукцию белка p53, причем измеряя и фосфорилированные формы этого белка p53 (S46) и p53 (S15), которые имеют различные функции в клетке. Ранее мы показали, что ионизирующая радиация в дозе 6 Гр достоверно увеличивает уровень p53 в клетке, а также увеличивает уровень фосфорилирования p53 (S46) и p53 (S15) [3]. На этом фоне добавление после облучения двух форм пероксидазы к клеткам в сочетании

с GA показывает очевидный защитный эффект, нормализуя уровень p53, а также способствуя выживанию клеток (рис. 2).

Одним из важных регуляторов клеточной активности является низкомолекулярный белок p21, продукт гена *CDKN1A*, впервые идентифицированный как циклонезависимый регулятор киназы (CDK) и играющий важную роль в контроле развития клеточного цикла. Белок p21 останавливает клеточный цикл во время G1 и S-фазы через связывание и ингибирование циклин-CDK1,2,4,6 комплексов [9]. Кроме того, оценка уровня p21 является важным показателем в качестве маркера сенесценции клеток.

Результаты показали, что рентгеновское облучение в сублетальной дозе увеличивает продук-

Таблица 1. Жизнеспособность клеток Balb/3Т3, в % от контроля \pm SE

	контроль	6 Гр	6 Гр + GA	6 Гр + GA + Prdx6	6 Гр + GA + S32A	6 Гр + Prdx6	6 Гр + S32A
Жизнеспособность клеток	100 \pm 8.2	61.8 \pm 7.2*	84.7 \pm 9.1#	70 \pm 6.9	72 \pm 7.1	88 \pm 8.8#	92 \pm 9.4#

* – достоверное отличие от контроля, # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

цию p21 в клетках, а GA, в сочетании с Prdx6 и, особенно, с его мутантной формой S32A полностью нормализует пролиферацию и снижает уровень сенесценции облученных 3T3 фибробластов (рис. 2). Кроме того, когда-то считалось, что белок p21 действует как опухолевый супрессор, главным образом, ограничивая клеточный цикл, что приводит к подавлению опухолевого роста. При углубленных исследованиях роли этого белка было обнаружено, что p21 регулирует радиационные ответы клеток за счет участия во множестве клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла, апоптоз, репарацию ДНК, старение и аутофагию [10]. Действительно, мы показали, что рентгеновское облучение в дозе 6 Гр значительно повышает продукцию p21, а присутствие GA в среде культивирования облученных фибробластов нормализует пролиферацию 3T3 клеток в присутствии Prdx6, при этом более эффективным оказалось использование белка-антисенесценции S32A (рис. 2).

Известно, что прямыми показателями клеточного стресса являются активация продукции белков теплового шока HSP90 α и HSP90 β , уровень продукции которых влияет на радиочувствительность клеток [11]. Мы обнаружили, что облучение 3T3 фибробластов приводит к достоверному увеличению конститутивной формы белка теплового шока HSP90, HSP90 β . При этом присутствие Prdx6 в среде культивирования клеток в сочетании с GA заметно снижает стрессовый ответ клеток 3T3 на рентгеновское облучение. Важно отметить, что и в этом случае более эффективным было использование мутантной формы S32A в сочетании с GA (рис. 2). Следует отметить, что приведенные результаты не противоречат тому факту, что защитное действие Prdx6 в отношении фибробластов, подвергнутых воздействию ДНК-повреждающих агентов, было обнаружено почти 20 лет назад [12].

Важность разработки новых противолучевых средств связана не только с защитой при инцидентах радиоактивного загрязнения, но и при использовании лучевой терапии [13]. В настоящее время лучевая терапия является одним из основных методов лечения рака, при этом, несмотря на многие преимущества этого лечения, такие как неинвазивность, сохранение целостности органов и точность при нацеливании на опухоль, оно может привести к осложнениям в облученных здоровых тканях. По этой причине использование радиозащитных средств может в значительной степени снизить вероятность радиационно-индуцированных осложнений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ, проект № 20-015-00216.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McKelvey K.J., Hudson A.L., Back M., et al.* Radiation, inflammation and the immune response in cancer // *Mammalian Genome*. 2018. V. 29. P. 843–865.
2. *Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L.* Oxidatively generated base damage to cellular DNA // *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. V. 49. P. 9–21.
3. *Novoselova E.G., Sharapov M.G., Lunin S.M., et al.* Peroxiredoxin 6 applied after exposure attenuates damaging effects of X-ray radiation in 3T3 mouse fibroblasts // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 12. P. 1951.
4. *Li L., Wang L., You Q.D., et al.* Heat shock protein 90 inhibitors: An update on achievements, challenges, and future directions // *J. Med. Chem.* 2020. V. 12. № 63 (5). P. 1798–1822.
5. *Stankova K., Savova G., Nikolov V., et al.* HSP90 inhibitor geldanamycin as a radiation response modifier in human blood cells // *Dose-response*. 2015. V. 13. № 1. eCollection Jan-Mar 2015.
6. *Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E., et al.* The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals // *Free radical research*. 2017. V. 51. № 2. P. 148–166.
7. *Bai M., Ma X., Li X., et al.* The accomplices of NF- κ B lead to radioresistance // *Review Curr. Protein. Pep. t Sci.* 2015. V. 16. № 4. P. 279–294.
8. *Pei D., Zhang Y., Zheng J.* Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx // *Oncotarget*. 2012. V. 3. P. 228–235.
9. *Georgakilas A.G., Martin O.A., Bonner W.M.* p21: a two-faced genome guardian trends // *Mol. Med.* 2017. V. 23. P. 310–319.
10. *Kuang Y., Kang J., Li H., et al.* Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2021. V. 147. P. 987–1006.
11. *Schilling D., Kühnel A., Konrad S., et al.* Sensitizing tumor cells to radiation by targeting the heat shock response // *Cancer Lett.* 2015. V. 1. № 360 (2). P. 294–301.
12. *Dierick J.-F., Wenders F., Chainiaux F., et al.* Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. // *Biogerontology*. 2003. V. 4. № 3. P. 125–131.
13. *Sheikholeslami S., Khodaverdian S., Dorri-Givb M., et al.* The radioprotective effects of alpha-lipoic acid on radiotherapy-induced toxicities: A systematic review // *International Immunopharmacology*. 2021. V. 96. P. 107741.

GELDANAMYCIN ENHANCES THE RADIOPROTECTIVE EFFECT OF PEROXYREDOXIN 6 IN IRRADIATED 3T3 FIBROBLASTS

E. G. Novoselova^{a,#}, O. V. Glushkova^a, M. G. Sharapov^a, M. O. Khrenov^a, S. B. Parfenyuk^a, S. M. Lunin^a, T. V. Novoselova^a, A. K. Mubarakshina^a, R. G. Goncharov^a, and E. E. Fesenko^a

^a *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

[#]*e-mail: elenanov_06@mail.ru*

The aim of the study was to evaluate the possibility of increasing the radioprotective potential of peroxiredoxin 6 (Prdx6) and its mutant form S32A by their combined use with geldanamycin (GA) for 3T3 fibroblasts irradiated with X-rays at a dose of 6 Gy.

The mutant enzyme S32A, which does not have phospholipase activity, when combined with GA, exhibits a more pronounced radioprotective activity. The use of this combination of anti-radiation drugs completely abolishes the peak of NF- κ B activity in irradiated 3T3 cells. Another transcription factor, p53, which is an indicator of the level of cell apoptosis and increases upon irradiation, is also reduced by S32A in combination with GA. The low molecular weight protein p21, which is a marker of cell senescence and whose production increases upon irradiation, is also normalized when S32A is used in combination with GA. In addition, the use of this combination of radioprotective drugs significantly reduces the stress response of 3T3 cells to X-ray irradiation.

Keywords: X-ray radiation, 3T3 fibroblasts, apoptosis, cellular stress, senescence, peroxiredoxin 6, geldanamycin