



А.П. БУРЛАКА, Е.П. СИДОРИК

**РЕДОКСЗАВИСИМЫЕ
СИГНАЛЬНЫЕ
МОЛЕКУЛЫ
В МЕХАНИЗМАХ
ОПУХОЛЕВОГО
ПРОЦЕССА**

НАЦИОНАЛЬНАЯ
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ,
ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ
им. Р.Е. КАВЕЦКОГО



NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES OF UKRAINE
R.E. KAVETSKY INSTITUTE
OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY
AND RADIOBIOLOGY



A.P. BURLAKA, E.P. SIDORIK

REDOX-DEPENDENT SIGNAL MOLECULES IN MECHANISMS OF TUMOR PROCESS

«SCIENTIFIC BOOK»
PROJECT

KYIV • NAUKOVA DUMKA • 2014

А.П. БУРЛАКА, Е.П. СИДОРИК

РЕДОКСЗАВИСИМЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ В МЕХАНИЗМАХ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

*ПРОЕКТ
«НАУКОВА КНИГА»*

КИЕВ • НАУКОВА ДУМКА • 2014

В монографии раскрыты общие звенья редоксзависимых механизмов канцерогенеза. Установлено, что первичными и последующими этапами метаболического перепрограммирования митохондрий является нерегулируемое нарастание скорости генерирования $O_2^{\cdot -}$, формирование клеточной гипоксии, активация ферментов деструкции межклеточного матрикса и неоваскуляризации, накопление окислительно-индуцированных мутаций в митохондриальном и ядерном геноме, нарушение сигнализации и как следствие инициация опухолевого процесса. В этих условиях в опухоли формируется клон клеток, устойчивых к цитотоксическому действию $O_2^{\cdot -}$ и $NO^{\cdot}$, а энергия радикалов кислорода используется на обеспечение ее роста и прогрессирования. Впервые доказано, что $O_2^{\cdot -}$ инициируют пролиферацию и метастазирование, формируют условия для миграции, экстравазации клеток опухоли и рост микрометастазов. Разработка на этой основе новых технологий восстановления редокс-состояния клеток может оптимизировать профилактику и регулирование опухолевого процесса.

Для онкологов, биофизиков, биохимиков, патофизиологов.

У монографії розкрито загальні ланки редоксзалежних механізмів канцерогенезу. Встановлено, що первинними і подальшими етапами метаболічного перепрограмування митохондрій є нерегульоване наростання швидкості генерування $O_2^{\cdot -}$, формування клітинної гіпоксії, активація ферментів деструкції міжклітинного матриксу і неоваскуляризації, накопичення окисно-індукованих мутацій в мітохондріальному та ядерному геномі, порушення сигналізації і як наслідок ініціація пухлинного процесу. За цих умов у пухлині формується клон клітин, стійких до цитотоксичної дії $O_2^{\cdot -}$ і $NO^{\cdot}$, а енергія радикалів кисню використовується на забезпечення її росту та прогресування. Вперше доведено, що $O_2^{\cdot -}$ ініціюють процеси проліферації і метастазування, забезпечуючи міграцію, екстравазацію клітин пухлини і ріст мікрометастазів. Розроблені на цій основі нові технології відновлення редокс-стану клітин можуть оптимізувати профілактику та регулювання пухлинного процесу.

Для онкологів, біофізиків, біохіміків, патофізіологів.

Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор *Г.П. Потехня*,
доктор биологических наук, профессор *М.С. Мирошниченко*

*Утверждено к печати ученым советом
Института экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (протокол № 7 от 30.04.2013)*

**Видання здійснено за державним замовленням
на випуск видавничої продукції**

Научно-издательский отдел медико-биологической,
химической и геологической литературы

Редакторы *Н.С. Колосок, Е.С. Потийчук*

© А.П. Бурлака, Е.П. Сидорик, 2014
© НВП «Видавництво “Наукова думка”
НАН України», дизайн, 2014

ВВЕДЕНИЕ

Энергия, необходимая для выполнения различных функций живой клеткой, утилизируется последней в трансформированном виде после ее превращения в аденозинтрифосфат. Благодаря открытиям В.А. Энгельгардта и В.А. Белицера установлено, что такая трансформация энергии осуществляется в процессе окислительного фосфорилирования, биологическое значение которого заключается в ресинтезе аденозинтрифосфата из аденозиндифосфата и неорганического фосфора. В.А. Белицер сделал теоретический вывод о том, что окислительное фосфорилирование связано с переносом электронов в дыхательной цепи митохондрий, А. Ленинджер и другие исследователи установили, что цикл окислительного фосфорилирования реализуется в митохондриях.

Благодаря открытию явления электронного парамагнитного резонанса Е.К. Завойским появилась возможность проводить исследования переноса электронов в митохондриях методом электронного парамагнитного резонанса.

В последние годы изучению процессов в организме, которые происходят с участием кислорода, уделяют особое внимание. Системы утилизации кислорода находятся в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и используют его при генерировании сигнальных молекул. В клетках существует разветвленная сеть сигнальных путей ответа клетки на повреждение, в которой радикальные формы кислорода, принимающие участие в запуске и реализации направлений реагирования этих

систем, могут вызывать конструктивные и деструктивные эффекты в зависимости от уровней образования супероксидных радикал-анионов.

Механизмы функционирования супероксидных радикал-анионов имеют значение прежде всего в связи с широким признанием их роли в этиологии и патогенезе злокачественного роста, старения, что является актуальной проблемой современной медицины. Нарушение редокс-состояния белковых электронтранспортных комплексов дыхательной цепи митохондрий запускает внутримитохондриальное генерирование супероксидных радикал-анионов и реализацию ими оксидных повреждений молекулярных компонентов клеток. Причинно-следственная взаимосвязь этих явлений на современном этапе не до конца изучена. Сложность проблемы состоит во включении петли положительной обратной связи, в которой супероксидные радикал-анионы, вызвав первичные оксидные повреждения, инициируют аутокаталитически, по типу цепных реакций, интенсификацию их образования. Радикальные формы кислорода сосуществуют в общей реактивной среде.

Триггерами инициации нарушений редокс-состояния в клетках могут быть различные факторы, в частности химические канцерогены, ионизирующая радиация, УФ-излучение, нарушения гормонального баланса, флуктуации метаболических потоков. Митохондрии концентрируют большую часть метаболических путей, редокс-переносчиков и редокс-центров, которые потенциально способны к одноэлектронному восстановлению кислорода до супероксидного радикал-аниона — предшественника других радикалов. Внутриклеточное генерирование супероксидных радикал-анионов — неминуемый и физиологически необходимый процесс. Для полного восстановления кислорода необходимо одновременное перенесение на молекулу кислорода четырех электронов, которое сопровождается образованием двух молекул воды или эквивалентных ей соединений. В случае восстановления кислорода меньшим чем четыре числом электронов образуются нестабильные метаболиты — радикалы кислорода.

Оксид азота в организме человека синтезируется непрерывно ферментативным путем, регулирует многочисленные физиологические функции, принимает участие в развитии многих патологических состояний. Единый субстрат NO-синтаз — *L*-аргинин.

При конститутивных уровнях синтеза супероксидные радикал-анионы и оксид азота действуют как специфические сигнальные молекулы, регулирующие иммунные процессы, функционирование сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем организма, являясь неотъемлемыми составными механизмов контроля гомеостаза, окислительно-восстановительной регуляции биологических процессов.

Авторами монографии реализована задача обобщения результатов собственных исследований с эффективным использованием метода электронного парамагнитного резонанса и рассмотрения на современном уровне с привлечением данных литературы проблемы функционирования редоксзависимых сигнальных молекул — супероксидных радикал-анионов и оксида азота в механизмах инициации развития злокачественных опухолей с целью создания современных программ профилактики и регуляции опухолевого процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Восстановление у опухолевых клеток способности, характерной для нормальных, при которой нерегулируемый уровень супероксидных радикал-анионов инициирует смерть клеток путем апоптоза представляет собой важную задачу онкологии. Злокачественные клетки при этом используют редоксзависимые молекулы для достижения своих преимуществ в метаболизме над окружающими их клетками. Опухолевые клетки находятся в сложном микроокружении и вместе со стромальными компонентами участвуют в повышении уровня редоксзависимых молекул, способствуя опухолевой прогрессии. Экспериментальные и клинические данные подчеркивают ключевую роль супероксидных радикал-анионов во всех аспектах опухолевого роста. Редоксзависимые молекулы в опухолевых клетках усиливают мутационный потенциал, регулируют внутриклеточные сигнальные пути клеточной пролиферации, выживания, подвижности клеток и их инвазивность. Кроме того, $O_2^{\bullet -}$ контролируют реактивность стромальных компонентов опухоли, что также является основой для роста опухолевых клеток, их распространения, развития воспаления, восстановления тканей и поддержки неоангиогенеза. Указанные признаки, характерные практически для всех опухолевых клеток, позволяют им расти в чужой и враждебной окружающей среде, избегать влияния эндогенных защитных систем. В опухолевых клетках высокий уровень супероксидных радикал-анионов может быть обусловлен усилением основного обмена, возникшей клеточной гипоксией при митохондриальной дисфункции и митоптозе/митофагии, деятельностью пероксисом, а также повышенной активностью мощных источников супероксидных радикал-анионов, таких, как NADPH-оксидазы (NOXes) и липоксигеназы (LOXes).

Отметим формирование редоксзависимой самодостаточности в обеспечении роста опухоли, т. е. способности нескольких опухолевых клеток аутокринно синтезировать факторы роста и цитокины,

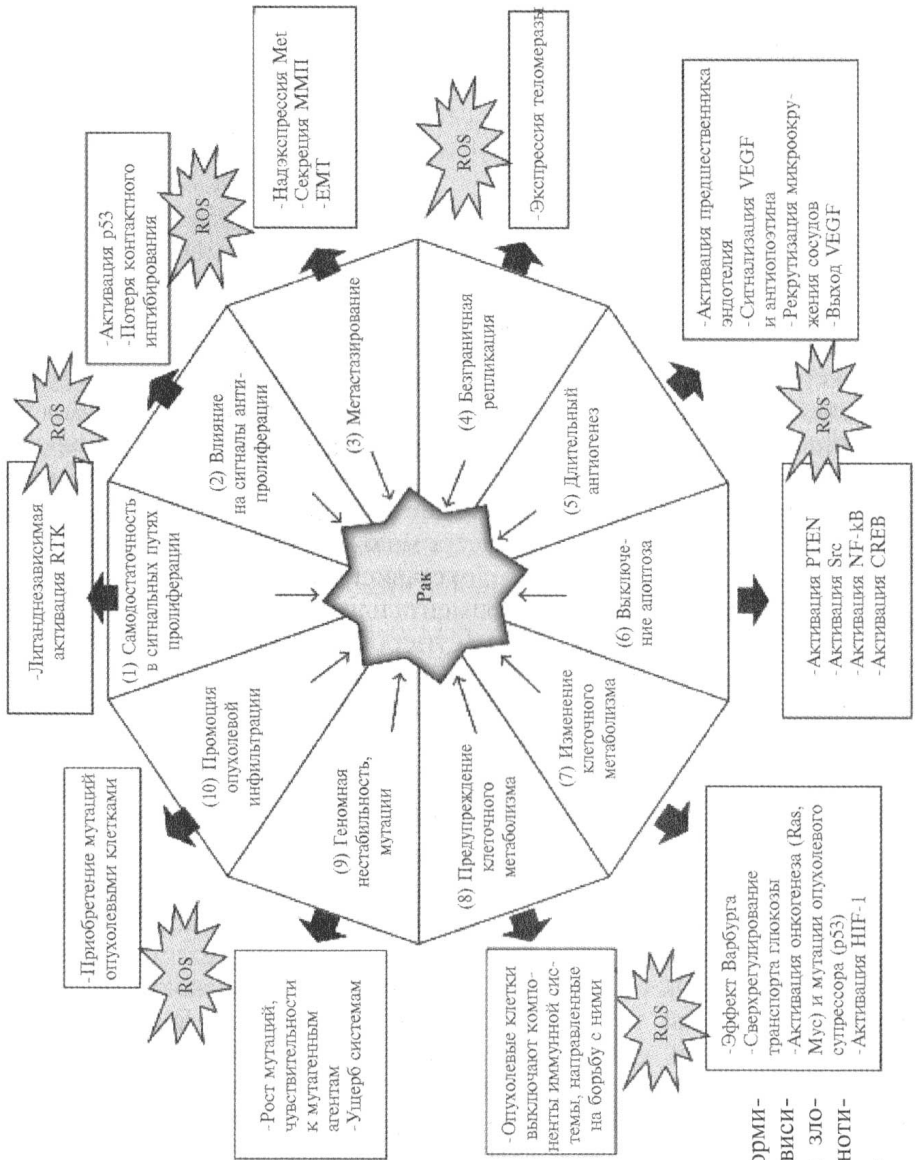


Рис. 1.3. Схема формирования редоксзависимыми молекулами злокачественного фенотипа клеток опухоли. Пояснения в тексте

а также молекулы, обеспечивающие компенсаторные механизмы роста. Большинство нормальных клеток начинают деление после внешней регуляторной сигнализации.

На опухолевые клетки воздействует модифицированная $O_2^{\bullet}$ извращенная сигнализация, инициирующая пролиферацию. Супероксидные радикал-анионы активируют редоксзависимые механизмы потери чувствительности к природным сигналам регулирования роста и торможения через лиганднезависимую RTK-трансактивацию, снижение порога RTK активации, уклонение от запуска апоптоза. Опухолевые клетки избегают апоптоза в связи со снижением клеточной адгезии по супероксидзависимому механизму, а также гибели, индуцированной химиотерапевтическими препаратами. Помимо уклонения от апоптоза раковые клетки также избегают старения и достигают предельной продолжительности жизни. Последнее они реализуют благодаря способности усиливать клеточную гипоксию, метастазирование и неоваскуляризацию по редоксзависимому механизму активации ферментов межклеточного матрикса и васкулярного эндотелиального фактора роста, что формирует колонии из опухолевых клеток. Действительно, опухолевые клетки приобретают способность инициировать редоксзависимые механизмы неангиогенеза или васкулогенеза. Последнее обеспечивает агрессивность опухолей, повышает их способность вторгаться в окружающие ткани, их подвижность и способность к протеолитическому модифицированию базальной мембраны и внеклеточного матрикса. Таким образом, $O_2^{\bullet}$ инициируют развитие рака и его прогрессирование, формируя злокачественный фенотип (рис. 1.3).

Последствия влияния нерегулированного генерирования радикалов кислорода на биологию опухолевых клеток сложны и носят плеiotропный характер. Радикалы кислорода, постоянно перепрограммируя метаболизм клеток опухоли и стромы, создают условия для выполнения программы опухолевой прогрессии: усиливают эффект О. Варбурга, супероксидзависимое регулирование активности ферментов межклеточного матрикса, транспортера глюкозы, активации онкогенов Ras и Мус, окислительно-индуцированных мутаций опухолевых супрессоров (p53) и активности HIF-1,2. Высокие уровни супероксидных радикал-анионов в клетках опухоли экранируют ее от влияния Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и природных киллеров.

В настоящее время наши неполные знания всей сети реакций и эффектов супероксидных радикал-анионов тормозят вне-

дрение новых эффективных схем терапии, основанных на применении редоксзависимых противоопухолевых препаратов. Помимо того что супероксидные радикал-анионы непосредственно формируют мутагенный потенциал и нестабильность функционирования генома опухолевых клеток, они также эпигенетически способствуют развитию и прогрессированию рака, выступая в качестве сигнальных молекул для молекул адгезии, а также индукторов генетической программы прогрессирования. Кроме того, нерегулированный уровень окисления клеточных компонентов делает опухолевые клетки более уязвимыми, что становится причиной их спонтанной гибели и гибели в результате воздействия химиотерапевтических препаратов. Устойчивость системы к нерегулируемому росту уровней генерирования $O_2^{\bullet}$ представляется основным механизмом химио- и радиорезистентности опухоли.

CONCLUSION

Return of tumor cells to the characteristic of normal in which the unregulated level of superoxide radicals initiates cell death through apoptosis is an important task of oncology.

Under these circumstances malignant cells use the redox-dependent molecules to achieve the advantages in the metabolism as compared to surrounding cells. Tumor cells are found to exist in complicated microenvironment and in association with stromal components and play a role in increase the redox-sensitive molecules, therefore promoting tumor progression. Experimental and clinical data underscore the key role of superoxide radicals in all aspects of tumor growth. Redox-dependent molecules in tumor cells enhance mutational potential, regulate intracellular signaling pathways of cell proliferation, survival, motility and invasiveness. Moreover, superoxide radicals control the reactivity of the stromal components of the tumor, which is also the basis for the tumor cells growth, their proliferation, development of inflammation, tissue repair and support of neoangiogenesis. Certain features of virtually all tumor cells allow their growth in the own and foreign environment, make them able to avoid the influence of endogenous protective systems. In tumor cells high levels of superoxide radicals derived from metabolic reprogramming of mitochondria, enhanced basal metabolism, mitoptosis/mitofagy, peroxisome activities, as well as increased activity of powerful sources of superoxide radicals and NO — NADPH-oxidase (NOXes) and lipoxxygenase (LOXes) exist.

It has to be noted also the formation of redox-sensitive self-sufficiency in tumor growth, i. e. the ability of several tumor cells to synthesize in autocrine manner growth factors and cytokines, as well as molecules that provide the compensatory mechanisms of growth. Most normal cells begin to divide after the external regulatory signaling influence. Tumor cells can be affected by modified superoxide radicals, changed signaling, leading to initiation of proliferation. Superoxide radicals activate redox-dependent mechanisms of loss of sensitivity to the natural signals controlling the growth and inhibition through the ligand-inde-

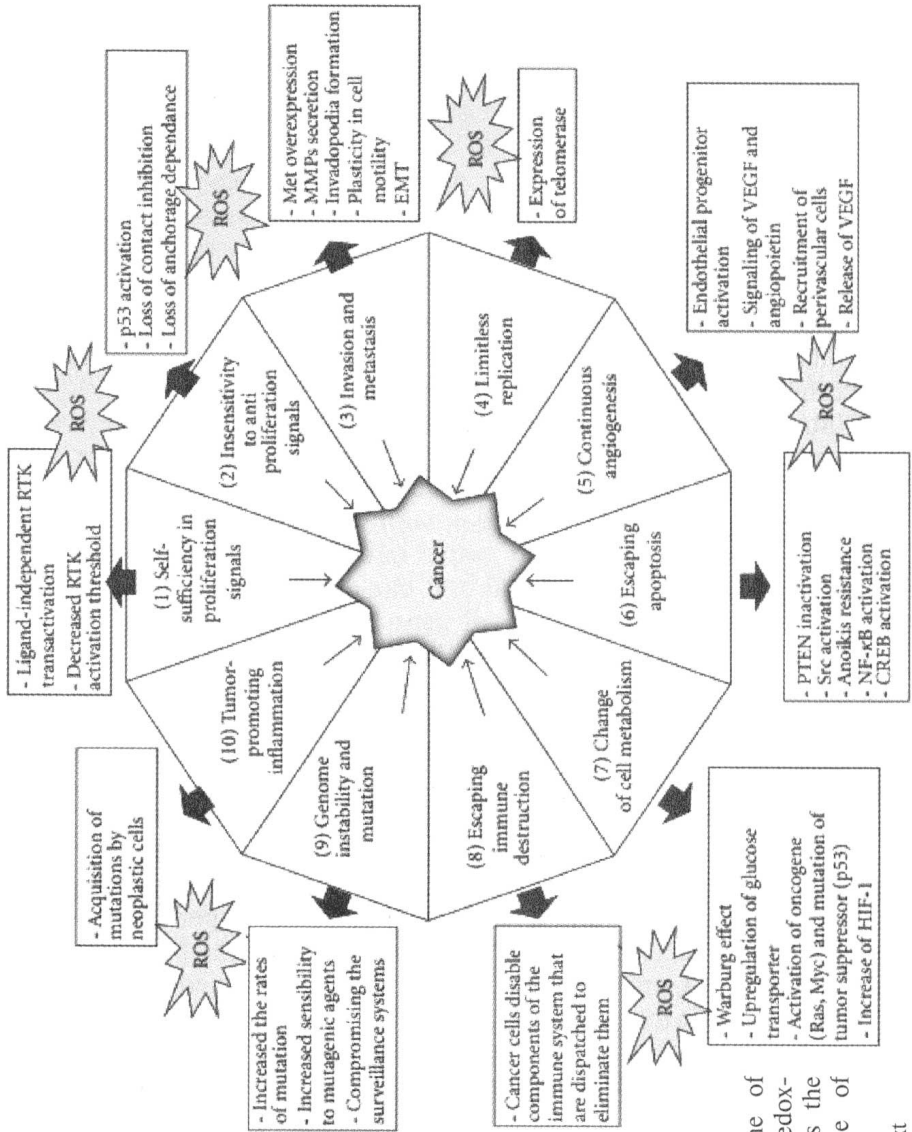


Fig. 1.C. The scheme of formation by the redox-dependent molecules the malignant phenotype of tumor cells. Description is in the text

pendent RTK-transactivation, reduction of the threshold of RTK activation, escape from apoptosis. Tumor cells escape from apoptosis due to the reduced cell adhesion by superoxide-dependent mechanism, as well as death induced by chemotherapeutic drugs. In addition to escape from apoptosis, cancer cells also avoid aging and reach the unlimited duration of life. They implement capacities described above due to their ability to strength cellular hypoxia, metastasis and neo-vascularization by redox-dependent mechanism of enzyme activation in the extracellular matrix and activation of vascular endothelial growth factor, formation the tumor cells colonies. In fact, tumor cells acquire the ability to initiate the redox-dependent mechanisms of neoangiogenesis or vasculogenesis. The latter provides the aggressiveness of tumors, increases their ability to invade surrounding tissues, their mobility and ability to proteolytic modification of the basement membrane and extracellular matrix. Thus, the superoxide radicals initiate the development of cancer and its progression, forming a malignant phenotype (Fig. 1.C).

Effects of exposure to unregulated generation of oxygen radicals on the biology of tumor cells are complex and pleiotropic. Oxygen radicals constantly reprogramming metabolism of tumor cells and stroma create an appropriate condition for the program in tumor progression: by strengthening Warburg effect, superoxide-dependent regulation of the extracellular matrix enzymes activity, glucose transporter, activation of oncogenes Ras, Myc, redox-induced tumor suppressor mutations (p53) and HIF-1,2. High levels of superoxide radicals in tumor cells shelter her from the influence of T- and B-lymphocytes, macrophages and natural killer cells. Currently, our incomplete knowledge of the entire network of reactions and effects of superoxide radicals inhibit the introduction of new and effective treatment regimens based on the use of redox-dependent anticancer drugs. Besides the fact that superoxide radicals directly create the mutagenic potential and instability of the genome function of tumor, cells, they also contribute to epigenetic development and progression of cancer by acting as signaling molecules for adhesion molecules, as well as inducers of the genetic program of progression. In addition, unregulated level of oxidation of cellular components, makes tumor cells more vulnerable, which becomes the cause of their spontaneous death and destruction upon exposure to chemotherapeutic drugs. Stability of the system to unregulated growth levels of superoxide generation is a main mechanism of chemo- and radiation-resistance of tumors.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Список принятых сокращений	8
Глава 1. Редоксзависимые механизмы развития злокачественных опухолей	9
1.1. Механизм генерирования супероксидных радикал-анионов в митохондриях	11
1.2. Белковые электронтранспортные комплексы митохондрий клеток, генерирующие супероксидные радикал-анионы при опухолевом процессе	12
1.3. Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для супероксидных радикал-анионов	18
1.4. Митохондриальные системы детоксикации радикальных форм кислорода	18
1.5. Пероксиредоксины и другие редоксины	22
1.6. Роль редокс-состояния каталитического цикла цитохрома P-450 в механизмах химического канцерогенеза, индуцированного в молочных железах, печени, яичниках и легких	23
1.7. Роль супероксидных радикал-анионов в механизмах влияния на организм ионизирующей радиации низкой мощности	36
Глава 2. Роль оксида азота в механизмах канцерогенеза	40
2.1. Регуляция редокс-состояния митохондрий оксидом азота	41
2.2. Регуляция генерирования супероксидных радикал-анионов цитохром с-оксидазой	42
2.3. Взаимодействие оксида азота с другими белковыми электрон-транспортными комплексами митохондрий	43
2.4. Роль пероксинитрита в регуляции редокс-состояния митохондрий	44
2.5. Инициация пероксинитритом генерирования супероксидных радикал-анионов в митохондриях	45
2.6. Участие оксида азота в регуляции редокс-состояния белков митохондриального матрикса	47
2.7. Регулирование уровня пероксинитрита в митохондриях	49
2.8. Синтез оксида азота в организме. Характеристика синтаз оксида азота	51
2.9. Молекулярная организация NO-синтаз	54
2.10. Синтез оксида азота в условиях дефицита кислорода	55
2.11. Механизм действия оксида азота	56

2.12. Роль оксида азота в механизмах канцерогенеза. Комплексы NO-FeS-белки — маркеры метаболического перепрограммирования транспорта электронов в митохондриях клеток при злокачественной трансформации	57
2.13. Редокс-состояние электронтранспортных комплексов дыхательной цепи митохондрий клеток органов в условиях длительного влияния на организм ионизирующей радиации низкой мощности	62
2.14. Образование комплексов NO-Hb в крови детей, подвергающихся действию ионизирующей радиации	64
2.15. Образование комплексов NO-Hb в крови больных со злокачественными опухолями ободочной кишки	66
Глава 3. Супероксидные радикал-анионы — источник других радикальных форм кислорода в клетках. Роль гидроксильных радикалов при канцерогенезе	70
Глава 4. Система защиты организма от радикальных форм кислорода	77
Глава 5. Регулирование редоксзависимых процессов при химическом и радиационном канцерогенезе	84
Глава 6. Биологические функции металлопротеидов, содержащих железо и медь, их роль в защите организма от радикалов кислорода	88
6.1. Формы железа в организме, его депонирование и транспорт	88
6.2. Роль церулоплазмينا в гомеостазе железа и меди	91
6.3. Антиоксидантная и прооксидантная роль церулоплазмينا	91
Глава 7. Супероксидзависимое повреждение ДНК при опухолевом процессе	94
7.1. Супероксидзависимое индуцирование нестабильности функционирования генома	94
7.2. Повреждение ДНК радикалами кислорода	96
7.3. 8-OxodGu — маркер окислительного повреждения ДНК	97
7.4. ДНК-повреждающая активность радикалов кислорода при химическом канцерогенезе. Перспективы применения в клинике маркера окислительных модификаций ДНК — 8-oxodGu	98
7.5. Окислительные модификации ДНК у детей, которые длительное время находились под влиянием ионизирующей радиации низкой мощности	105
Глава 8. Редокс-регуляция активности ферментов межклеточного матрикса при опухолевом процессе	109
8.1. Матриксные металлопротеиназы — структура и функции	109
8.2. Механизмы активации матриксных металлопротеиназ	112
8.3. Роль матриксных металлопротеиназ и тканевых ингибиторов в перестройке тканей	114
8.4. Роль матриксных металлопротеиназ в процессах ремоделирования межклеточных взаимодействий при опухолевой инвазии и метастазировании	117

8.5. Редоксзависимое регулирование активности желатиназы-2 (ММП-2) и желатиназы-9 (ММП-9) в злокачественных опухолях желудка и ткани желудка, прилегающей к опухоли	123
8.6. Митохондриальный редокс-контроль ремоделирования межклеточного матрикса у больных раком молочной железы	125
8.7. Редоксзависимое регулирование матриксных металлопротеиназ и эндотелиального фактора роста в опухолях и сосудах аденокарциномы молочной железы	133
Глава 9. Роль редоксзависимых молекул в механизме действия противоопухолевой аутовакцины, развитии сахарного диабета I типа и его осложнений	141
Глава 10. Молекулярное строение, функции нейтрофилов и их регуляторная роль при опухолевом процессе	160
10.1. Модели взаимодействий компонентов NADPH-оксидазы при активации	167
10.2. Роль NADPH-оксидаз в редокс-регуляции функций стволовых клеток и клеток-предшественников при опухолевом процессе	170
10.3. Роль NADPH-оксидаз в инвазии и неоваскуляризации при опухолевом процессе	172
Глава 11. Дисфункция митохондрий и терапевтические стратегии ее регулирования у больных раком молочной железы	179
Глава 12. Редоксзависимые механизмы взаимодействия опухоли с костным мозгом	191
Глава 13. Регулирование редокс-состояния электронтранспортной цепи митохондрий клеток органов при введении доксорубина	202
Глава 14. Влияние антикоагулянтов на редокс-состояние нейтрофилов, тромбоцитов и выживаемость больных раком прямой кишки	220
Заключение	229
Conclusion	233
Список литературы	236