УДК 577.121.7:542.943-092'78:618.19
©Коллектив авторов

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ПРИ МОДУЛЯЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Степовая[1], Е.В. Шахристова[1]*, Н.В. Рязанцева[2,3], О.Л. Носарева[1], В.Д. Якушина[1], А.И. Носова[1], В.С. Гулая[1], Е.А. Степанова[1], Р.И. Чильчигашев[1], В.В. Новицкий[1]

[1]Сибирский государственный медицинский университет,
634050, Томск, Московский тракт, 2; тел.: (3822) 53-04-23; эл. почта: shaxristova@yandex.ru
[2]Сибирский федеральный университет, Красноярск
[3]Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

Исследовали уровень окислительной модификации белков, состояние системы глутатиона и тиоредоксина в условиях модуляции редокс-статуса эпителиальных клеток молочной железы линии HBL-100 с помощью N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола. При культивировании клеток в присутствии N-этилмалеимида происходит снижение их редокс-статуса, увеличение активности глутатионредуктазы и повышение концентрации продуктов необратимой окислительной модификации белков и аминокислот. Добавление в культуральную среду протектора SH-групп способствовало смещению редокс-статуса в сторону восстановительных процессов и возрастанию обратимой модификации протеинов с помощью глутатионилирования. Предложенная модель внутриклеточной редокс-модуляции может быть использована при разработке новых терапевтических подходов для лечения заболеваний, сопровождающихся нарушением редокс-гомеостаза (онкологических, воспалительных, сердечно-сосудистых, нейро-дегенеративных и др.).

Ключевые слова: окислительный стресс, редокс-статус клетки, окислительная модификация белков, клетки эпителия молочной железы

DOI: 10.18097/PBMC20166201064

ВВЕДЕНИЕ

Редокс-статус клеток играет важную роль в патогенезе многих заболеваний (сердечно-сосудистые, нейро-дегенеративные, воспалительные, онкологические и др.), а также процессов адаптации и старения [1]. В поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза большое значение имеют системы глутатиона, тиоредоксина, глутаредоксина и другие, функционирование которых приводит к снижению уровня активных форм кислорода (АФК), изменению активности факторов транскрипции и экспресии ряда генов [1, 2]. Одним из важнейших элементов редокс-системы клеток выступают АФК, выполняющие функции, в том числе, вторичных месенджеров и реализующие лиганд-рецепторные взаимодействия факторов транскрипции, гормонов, медиаторов и цитокинов [1, 3, 4]. Благодаря высокой реакционной способности, АФК в низких концентрациях играют роль регуляторных молекул различных клеточных функций, таких как пролиферация, апоптоз, межклеточный сигналлинг, хемотаксис, мембранная рецепция [1, 5, 6].

В тоже время, нарушение внутриклеточного баланса между антиоксидантами и прооксидантами приводит к накоплению АФК, способствующих окислительному повреждению макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот), активации протеолитических ферментов, повреждению структуры мембран, что способствует нарушению регуляции процессов пролиферации, апоптоза, межклеточного взаимодействия, рецепции [1, 3, 4, 7-9]. Особую роль в этих процессах отводят окислительной модификации белков (ферментов, компонентов цитоскелета, рецепторов, факторов транскрипции и др.), которая служит маркером интенсивности свободнорадикального окисления в клетках [3, 10-12]. Необратимая модификация функциональных групп, приводящая к образованию карбонильных производных белков, изменению структуры их аминокислотных остатков, в частности триптофана, тирозина, цистеина, способствует появлению новых продуктов, которые являются причиной вторичного повреждения других биомолекул [3]. Для предотвращения необратимой структурной модификации макромолекул и потери их функций в клетках существуют механизмы защиты SH-групп белков посредством глутатионилирования, в том числе и транскрипционных факторов (NF-κB, p53, Nrf2 и AP-1), играющих важную роль в регуляции апоптоза и пролиферации клеток [6].

Клеточные культуры являются удобной модельной системой для исследований различных патологических процессов *in vitro*, поскольку их использование позволяет исключить многие неспецифические факторы, сопровождающие редокс-модуляцию *in vivo*. Модуляция редокс-статуса в эпителиальных клетках молочной железы под действием N-этилмалеимида, блокатора SH-группы белков и пептидов, и 1,4-дитиоэритритола, протектора тиоловых групп, может быть использована в качестве модели изменения внутриклеточного редокс-гомеостаза и применяться для установления роли редокс-белков, систем глутатиона и тиоредоксина в регуляции пролиферации и апоптоза клеток при развитии различных патологических процессов.

* - адресат для переписки

Цель данной работы была оценка уровня окислительной модификации белков, состояния системы глутатиона и тиоредоксина в условиях модуляции редокс-статуса эпителиальных клеток молочной железы линии HBL-100 с помощью N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали культуру клеток эпителия молочной железы человека (HBL-100), полученную из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург). Клетки линии HBL-100 культивировали адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 ("ПанЭко", Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("Invitrogen", США), 0,3 мг/мл L-глутамина ("ПанЭко") и 100 мкг/мл гентамицина ("INS", США). Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим ("Serva", США).

Редокс-статус клеток эпителия молочной железы моделировали, инкубируя клетки в течение 18 ч при 37°C и 5% CO_2 в присутствии 5 мМ N-этилмалеимида (NEM, "Sigma Aldrich", США) [13] или 5 мМ 1,4-дитиоэритритола (DTE, "Sigma Aldrich"), протектора SH-групп протеинов и пептидов [14].

Интенсивность окислительной модификации протеинов в интактных клетках линии HBL-100 и при модуляции редокс-статуса оценивали по содержанию карбонильных производных белков, окисленного триптофана, битирозина и связанного с белками глутатиона. Концентрацию карбонильных производных белков определяли в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином; образовавшиеся 2,4-динитрофенилгидразоны регистрировали спектрофотометрически при 274 нм (альдегид-фенилгидразоны) или 363 нм (кетондинитро-фенилгидразоны) [15]. Содержание окисленного триптофана определяли по снижению флуоресценции его восстановленной формы (при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм); образование битирозиновых сшивок (флуоресцирующих при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм) регистрировали методом Davies [16] в модификации Бекмана и соавт. [17]. Уровень связанного с белками глутатиона определяли спектрофотометрическим методом после предварительного высвобождения трипептида боргидратом натрия из связи с белками [18].

Состояние глутатион-зависимой системы антиоксидантной защиты клеток линии HBL-100 оценивали по содержанию восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона, которые определяли, как описано Rahman и соавт. [19]. В данной работе мы приводим только величину отношения восстановленной формы трипептида к окисленной (GSH/GSSG), поскольку она в полной мере отражает редокс-потенциал системы глутатиона.

Определение концентрации SH-групп белков в клетках эпителия молочной железы определяли в реакции с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой; образовавшуюся тио-2-нитробензойную кислоту определяли спектрофотометрически при 412 нм [18].

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) оценивали по NADPH-зависимому восстановлению GSSG и последующей реакции GSH с 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой; образовавшуюся тио-2-нитробензойную кислоту определяли спектрофотометрически при 412 нм [20]. Активность тиоредоксинредуктазы (КФ 1.8.1.9) определяли по NADPH-зависимому восстановлению дисульфидных связей субстратов и последующей реакции с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой; образовавшуюся тио-2-нитробензойную кислоту определяли спектрофотометрически при 412 нм [21]. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина белковых молекул [22].

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез с применением программы SPSS 11.0 for Windows. Проверку на соответствие выборок нормальному закону распределения проводили, используя критерий Шапиро-Вилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p<0,01$ и $p<0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1–Q_3). Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Краскала-Уолиса и Манна-Уитни для малых групп. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p<0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток линии HBL-100 в присутствии блокатора SH-групп NEM приводило к снижению редокс-статуса клеток, которое сопровождалось трёхкратным уменьшением отношения GSH/GSSG и снижением в 11,8 раза концентрации SH-групп белков по сравнению с аналогичными значениями показателей в интактной культуре (табл. 1). В клетках линии HBL-100, культивируемых в присутствии NEM, отмечено повышению активности глутатионредуктазы в 2,1 раза по сравнению с интактной культурой (табл. 1).

Культивирование клеток линии HBL-100 с NEM приводило к снижению активности тиоредоксинредуктазы по сравнению с интактной культурой (табл. 1).

Культивирование в присутствии DTE способствовало смещению редокс-статуса клеток эпителия молочной железы в сторону восстановления, что проявлялось в увеличении отношения GSH/GSSG, повышении концентрации SH-групп белков и активности глутатионредуктазы по сравнению с аналогичными значениями показателей в интактной культуре (табл. 1).

Таблица 1. Активности глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы, концентрация SH-групп белков и величина отношения восстановленного глутатиона к глутатиондисульфиду (GSH/GSSG) в клетках эпителия молочной железы линии HBL-100 при действии блокатора SH-групп N-этилмалеимида (5 мМ) и протектора SH-групп 1,4-дитиоэритритола (5 мМ), Me (Q_1-Q_3).

Исследуемые показатели	Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100	Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100 + N-этилмалеимид	Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100 + 1,4-дитиоэритритол
Глутатионредуктаза, мкмоль/мин×мг белка	54,64 (51,99-56,29)	116,20* (106,03-117,69)	77,18* (72,45-78,57)
Тиоредоксинредуктаза, нмоль/мин×мг белка	5,35 (4,91-5,49)	3,82# (3,75-4,14)	4,96 (4,90-5,42)
GSH/GSSG, у. е.	11,50 (11,06-11,71)	3,78* (3,72-4,00)	18,52* (18,20-9,40)
SH-группы белков, нмоль/мг белка	3,55 (3,42-4,00)	0,30* (0,28-0,32)	8,87* (8,66-9,80)

Примечание: * - p<0,01 по сравнению с интактными клетками эпителия молочной железы линии HBL-100, # - p<0,05 по сравнению с интактными клетками эпителия молочной железы линии HBL-100.

Таким образом, блокатор и протектор тиоловых групп белков и пептидов способны модулировать редокс-статус клеток эпителия молочной железы, приводя к изменению функциональной активности глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы посредством увеличения/уменьшения концентрации GSH и GSSG.

Культивирование клеток линии HBL-100 в присутствии NEM приводило к активации необратимой окислительной модификации белков, что выражалось в увеличении содержания карбонильных производных в условиях спонтанного и катализируемого металлами с переменной валентностью окисления протеинов по сравнению с уровнем аналогичных показателей в интактных клетках (табл. 2).

Увеличение спонтанной и катализируемой металлами с переменной валентностью окислительной модификации протеинов при действии NEM, является маркером окислительного повреждения клеток линии HBL-100, при котором белки выступают в роли эффективных ловушек генерируемых активных форм кислорода [3]. Кроме того, модифицированные белки являются не только маркерами, но и активными участниками свободнорадикального повреждения клетки [10, 23], способствуя окислительной модификации других макромолекул.

Действии блокатора SH-групп NEM на клетки линии HBL-100 приводило к увеличению содержания битирозина и окисленного триптофана по сравнению с интактной культурой в 2,2 раза и 1,5 раза соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Показатели окислительной модификации белков в клетках эпителия молочной железы линии HBL-100 при действии блокатора SH-групп N-этилмалеимида (5 мМ) и протектора SH-групп 1,4-дитиоэритритола (5 мМ), Me (Q_1-Q_3).

Исследуемые показатели			Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100	Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100 + N-этилмалеимид	Клетки эпителия молочной железы линии HBL-100 + 1,4-дитиоэритритол
Карбонильные производные белков, у.е./мг белка	Спонтанная окислительная модификация белков	λ=274 нм	1,15 (0,78-1,48)	8,15* (7,88-12,09)	0,56* (0,49-0,61)
		λ =363 нм	1,85 (1,48-1,97)	20,77* (18,69-22,49)	1,01* (0,79-1,05)
	Катализируемая металлами с переменной валентностью окислительная модификация белков	λ =363 нм	8,13 (7,33-8,44)	22,06* (20,92-22,30)	3,07* (3,05-3,30)
		λ =274 нм	10,01 (9,13-10,76)	26,19* (22,84-27,25)	4,87* (4,18-5,10)
Битирозин, у.е./мг белка			0,86 (0,82-0,95)	1,85* (1,77-1,88)	0,54* (0,53-0,61)
Окисленный триптофан, у.е./мг белка			12,98 (12,20-13,23)	19,08* (18,81-19,36)	7,74* (7,51-8,27)
Белково-связанный глутатион, нмоль/мг белка			0,48 (0,44-0,59)	0,25* (0,24-0,31)	0,78* (0,73-0,84)

Примечание: * - p<0,01 по сравнению с интактными клетками эпителия молочной железы линии HBL-100.

Развитие свободнорадикального окисления под действием NEM в клетках эпителия молочной железы приводило к снижению уровня связанного с белками глутатиона в 1,9 раза ($p<0,01$) по сравнению с интактными клетками (табл. 2). Глутатионилирование белков является защитным механизмом клетки, направленным на сохранение структуры и функций протеинов. В тоже время, при смещении редокс-статуса клеток в сторону GSSG (снижение величины GSH/GSSG), восстановленная форма трипептида способна высвобождаться из связи с белками, формируя пул свободного GSH, необходимого для функционирования ферментов антиоксидантной защиты.

Таким образом, культивирование клеток линии HBL-100 в присутствии блокатора SH-групп приводило к смещению редокс-статуса в сторону окисления, что способствовало увеличению необратимой окислительной модификации белков и аминокислот.

Добавление DTE в среду инкубации клеток эпителия молочной железы оказывало выраженное протекторное действие, которое выражалось в снижении концентрации карбонильных производных белков при спонтанном и катализируемом металлами с переменной валентностью окислении, снижении содержания битирозина и окисленного триптофана по сравнению с аналогичными показателями в интактных клетках линии HBL-100 (табл. 2).

Под действием DTE, на фоне смещения редокс-статуса клеток линии HBL-100 в сторону увеличения концентрации GSH и соотношения GSH/GSSG, обнаружено повышение содержания связанного с белками глутатиона в 1,6 раза по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре (табл. 2). Глутатионилирование протеинов при действии протектора SH-групп представляет собой механизм обратимой модификации белковых молекул, способствующий редокс-регуляции внутриклеточных процессов, в том числе пролиферации и апоптоза [24, 25].

Таким образом, культивирование клеток линии HBL-100 в присутствии протектора SH-групп приводило к защите функциональных редокс-чувствительных SH-групп белков от необратимой окислительной модификации и способствовало активации обратимого глутатионилирования белков, являющегося одним из механизмов сохранения их структуры и функций, а также выступающим в роли резерва GSH, необходимого для поддержания редокс-гомеостаза клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Блокирование SH-групп под действием N-этилмалеимида приводило к нарушению редокс-гомеостаза клеток эпителия молочной железы (снижение величины GSH/GSSG, уменьшение концентрации SH-группы белков, увеличение активности глутатионредуктазы), возрастанию необратимой окислительной модификации белков и аминокислот. Дитиоэритритол оказывал протекторное действие на редокс-статус клеток линии HBL-100, способствовал глутатионилированию протеинов и защите от необратимых повреждений структуры белковых молекул. Предложенная модель внутриклеточной редокс-модуляции может быть использована при разработке новых терапевтических подходов для лечения заболеваний, сопровождающихся нарушением редокс-гомеостаза (онкологических, воспалительных, сердечно-сосудистых, нейро-дегенеративныхи др.).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда в рамках научного проекта "Тиоредоксин и глутаредоксин – как молекулярные маркеры возникновения и развития опухолей молочной железы" № 15-36-01289.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.* (2008) Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания, АРТА, Новосибирск, 284 с.
2. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н.* (2008) Усп. биол. химии, **48**, 319-358.
3. *Дубинина Е.Е.* (2006) Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты, Медицинская пресса, СПб., 400 с.
4. *Halliwell B.* (2012) Nutr. Rev., **70**, 257-265.
5. *Brigelius-Flohé R., Flohé L.* (2011) Antioxid. Redox Signal., **15**(8), 2335-2381.
6. *Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y.* (2012) Cell Signal., **24**, 981-990.
7. *Владимиров Ю.А.* (2000) Соросовский образовательный журнал, **6**(12), 13-19.
8. *Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Васильева О.А., Якушина В.Д., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В.* (2013) Бюллетень сибирской медицины, **12**(1), 49-54.
9. *Murphy M.P., Holmgren A., Larsson N.G., Halliwell B., Chang C.J., Kalyanaraman B., Rhee S.G., Thornalley P.J., Partridge L., Gems D. et al.* (2011) Cell Metab., **13**, 361-366.
10. *Лущак В.И.* (2007) Биохимия, **72**(8), 995-1015.
11. *Magi B., Ettorre A., Liberatori S., Bini L., Andreassi M., Frosali S., Neri P., Pallini V., Di Stefano A.* (2004) Cell Death Differ., **11**, 842-852.
12. *Wong C.M., Bansal G., Marcocci L., Suzuki Y.J.* (2012) Redox Rep., **17**, 90-94.
13. *Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **100**, 4001-4005.
14. *Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S.* (1995) Arch. Biochem. Biophys., **316**, 327-333.
15. *Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.* (2000) Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма, Фолиант, СПб., 103 с.
16. *Davies K.J.* (1987) J. Biol. Chem., **262**, 9895-9901.
17. *Бекман Э.М., Баранова О.А., Губарева Е.В., Москвина С.Н., Данилогорская Е.А., Азизова О.А.* (2006) Бюлл. экспер. биол. мед., **142**, 268-272.
18. *Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D.* (1978) J. Cell Biol., **76**, 439-447.
19. *Rahman I., Kode A., Biswas S.K.* (2006) Nat. Protoc., **1**, 3159-3165.

20. *Worthington D.J., Rosemeyer M.A.* (1976) Eur. J. Biochem., **67**, 231-238.
21. *Tamura T., Stadtman T.C.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 1006-1011.
22. *Bradford M.M.* (1976) Analyt. Biochem., **72**, 248-254.
23. *Curtis J.M., Grimsrud P.A., Wright W.S.* (2010) Diabetes, **59**, 1132-1142.
24. *Stadtman E.R., Levine R.L.* (2000) Ann. N.Y. Acad. Sci., **899**, 191-208.
25. *Hill B.G., Bhatnagar A.* (2012) Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function, J. Mol. Cell Cardiol., **52**, 559-567.

Поступила: 10. 06. 2015.
Принята к печати: 18. 08. 2015.

THE ROLE OF OXIDATIVE PROTEIN MODIFICATION AND THE GLUTHATIONE SYSTEM IN MODULATION OF THE REDOX STATUS OF BREAST EPITHELIAL CELLS

E.A. Stepovaya[1], E.V. Shakhristova[1], N.V. Ryazantseva[2], O.L. Nosareva[1], V.D. Yakushina[1], A.I. Nosova[1], V.S. Gulaya[1], E.A. Stepanova[1], R.I. Chil'chigashev[1], V.V. Novitsky[1]

[1]Siberian State Medical University,
2 Moskovky tract, Tomsk, 634050 Russia; tel.: 3822 53-04-23, e-mail: shaxristova@yandex.ru
[2]Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
[3]Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

The effects of the SH-group blocker N-ethylmaleimide (NEM) and thiol group protector 1,4-dithioerythritol (DTE) on the redox status of cells HBL-100 cells, oxidative modification of their proteins and the state of glutathione and thioredoxin systems have been investigated. Breast epithelial cells cultivated in the presence of NEM were characterized by decreased redox status, increased glutathione reductase activity, and increased concentrations of products of irreversible oxidative modification of protein and amino acids. Cultivation of HBL-100 cells in the presence of DTE resulted in a shift of the redox status towards reduction processes and increased reversible protein modification by glutathionylation. The proposed model of intracellular redox modulation may be used in the development of new therapeutic approaches to treat diseases accompanied by impaired redox homeostasis (e.g. oncologic, inflammatory, cardiovascular and neurodegenerative disease).

Key words: oxidative stress; cell redox status; protein oxidative modification; breast epithelial cells