

**Р-ГЛИКОПРОТЕИН, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЙ МНОЖЕСТВЕННУЮ
ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ, ПРЕПЯТСТВУЕТ ПРОЯВЛЕНИЮ
АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО НАПРАВЛЕННОГО
АНТИОКСИДАНТА SkQR1**

© *Е. К. Фетисова,¹ А. В. Аветисян, Д. С. Изюмов, М. В. Коротецкая,
В. Н. Ташлицкий, В. П. Скулачев, Б. В. Черняк*

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета;
¹электронный адрес: fetis@belozersky.msu.ru*

Митохондриальнонаправленные антиоксиданты семейства SkQ, накапливаясь в энергизованных митохондриях, защищают клетки от окислительного стресса, повышая уровень восстановленного глутатиона и понижая гибель клеток, индуцированную добавлением пероксида водорода. На примере ряда трансформированных линий клеток человека показано, что SkQR1 (флуоресцирующий представитель семейства SkQ) откачивается из клеток, резистентных к химиотерапии, посредством Р-гликопротеина — одного из основных транспортных белков, отвечающих за множественную лекарственную устойчивость, типичную для большого числа опухолевых новообразований. Показано также, что откачка SkQR1 тормозится ингибиторами Р-гликопротеина (верапамилем и плуронином L61). В экспериментах с клетками K562 выяснилось, что сублинния, чувствительная к химиотерапии, защищается посредством SkQR1 от апоптогенного действия пероксида водорода. В случае резистентной сублиннии такая защита имела место только после выключения Р-гликопротеина его ингибиторами.

Ключевые слова: митохондрии, антиоксиданты, окислительный стресс, множественная лекарственная устойчивость, Р-гликопротеин, SkQ.

Точка зрения, согласно которой митохондрии ответственны за продукцию значительных количеств активных форм кислорода в клетке в последние годы получает все большее подтверждение (Скулачев, 2007). Поэтому была предпринята попытка создать антиоксиданты, специфически адресованные внутрь митохондрий. Соединив заряженные положительно гидрофобные ионы децил-трифенилфосфония, проникающие через фосфолипидный бислой биологических мембран (Lieberman et al., 1969; Vakeeva et al., 1970; Lieberman, Skulachev, 1970), с природным антиоксидантом KoQ, Мерфи с коллегами (Kelso et al., 2002; Murphy, Smith, 2007) получили новое вещество — MitoQ, защищающее клетки от окислительного стресса. В лаборатории В. П. Скулачева был синтезирован другой ряд антиоксидантов, адресованных в митохондрии (семейство SkQ), состоящих из пластохинона (Q), осуществляющего антиоксидантную защиту, проникающего катиона (Sk), обеспечивающего доставку вещества в митохондрии, и деканового или пентанового линкера. На плоских бислойных фосфолипидных мембранах были отобраны производные SkQ с наибольшей проникающей способностью. Синтезированные антиоксиданты обладали значительно более высокими защитными функциями по сравнению с MitoQ и принципиально большим концентрационным «окном» между антиоксидантными и прооксидантными свойствами. Представители семейства SkQ являются регенерируемыми антиоксидантами мно-

гократного действия и, осуществив антиоксидантную защиту, быстро восстанавливались комплексами I и II дыхательной цепи митохондрий для повторного антиоксидантного акта (Антоненко и др., 2008). В настоящей работе были изучены два представителя этого семейства (рис. 1), а именно пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ1) и пластохинонил-децил-родамин 19 (SkQR1), в аспекте их возможного взаимодействия с Р-гликопротеином множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

МЛУ — это невосприимчивость клеток одновременно к целому ряду антиопухолевых химиотерапевтических препаратов разного химического строения (Van der Blik, Borst, 1989; Ставровская, 2000). Такой широкий спектр невосприимчивости обуславливается «откачкой» этих веществ из клеток посредством Р-гликопротеинов (Pgp) — мембранных белков-транспортёров, узнающих разнообразные гидрофобные органические соединения (Higgins, Gottesman, 1992; Нейфах, 2003). Транспортёры выводят эти вещества из цитоплазмы в наружную среду, чем защищают клетки от множества гидрофобных ядов, различающихся по структуре (Lewis, 1994). Наиболее изучен Pgp с мол. массой 170—190 кДа, являющийся транспортной АТФазой суперсемейства ABC. Pgp — продукт гена семейства *mdr* (Ng et al., 1989; Ambudukar et al., 1999). Благодаря гидрофобности и положительному заряду проникающего катиона, входящего в состав митохондриаль-

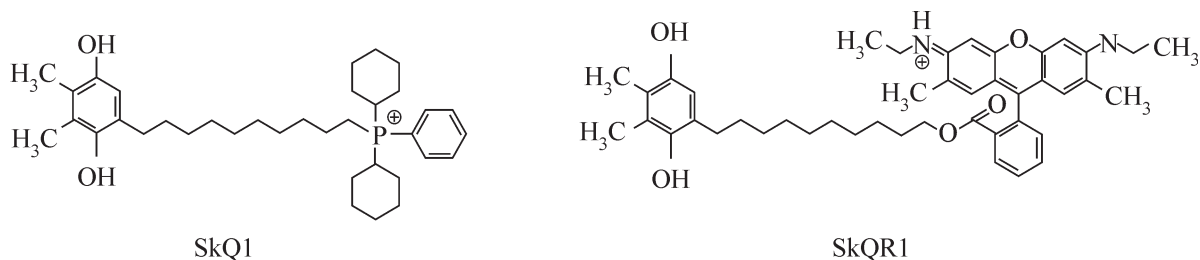


Рис. 1. Структурные формулы представителей семейства SkQ — пластохинонил-децил-трифенилфосфония (SkQ1) и пластохинонил-децил-родамина 19 (SkQR1).

но-адресованных антиоксидантов, эти антиоксиданты со значительной степенью вероятности могли бы, сохраняясь в нормальных тканях, выводиться из большого числа опухолевых новообразований, обладающих МЛЮ, с помощью транспортного белка Pgp. Этой проблеме посвящена настоящая статья (предварительное сообщение см.: Fetisova et al., 2010), в задачи которой входило охарактеризовать митохондриальнонаправленные антиоксиданты, исследовать выведение этих соединений из клеток, обладающих МЛЮ, и оценить их способность защищать клетки от окислительного стресса.

Материал и методика

Клетки. Использовали культуры следующих клеток: эпителий рака шейки матки человека HeLa, клетки лимфомы человека U937, нормальные фибробласты кожи человека, а также чувствительные и резистентные (обладающие МЛЮ) сублинии клеток рака молочной железы человека MCF-7 и эритролейкемии человека K562. Обе резистентные сублинии были получены посредством обработки чувствительных клеток доксорубицином. Данные линии представляют собой классическую модель клеток, обладающих МЛЮ, и широко используются при изучении МЛЮ (Kalinina et al., 2006). Культуры выращивали на средах DMEM и RPMI-1640 производства ПанЭко (Россия) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), глутамина и антибиотиков стрептомицина и пенициллина (по 100 Е/мл каждого). Клетки содержали в термостате при 37 °C и 5 % CO₂.

Для визуализации митохондрий использовали митохондриальный краситель митотрекер зеленый (Mitotracker Green, Molecular Probes, США). Накопление SkQ в клетках изучали, используя SkQR1 — флуоресцентный представитель семейства SkQ, в котором катионная группа трифенилфосфония замещена на родамином 19 (Скулачев, 2007; Антоненко и др., 2008). Динамику накопления и выхода SkQR1 изучали, используя проточный цитофлуориметр FC500 (Beckman Coulter, США). При одновременном добавлении SkQR1 и митотрекера зеленого по колокализации красной и зеленой окрасок (желтому цвету) отслеживали накопление антиоксиданта внутри митохондрий, используя конфокальный микроскоп Carl Zeiss с приставкой LSM 510 (Германия).

Для подавления МЛЮ были использованы как широко известные, так и недавно синтезированные ингибиторы Р-гликопротеина — верапамил и плуроник L61. Верапамил, давно известный блокатор кальциевых каналов, является также широко используемым ингибитором Р-гликопротеина (Safa, 1988; Tsuruo, Yusa, 1989). Плуро-

ник L61 входит в группу полимеров-плуроников, недавно открытых наименее токсичных ингибиторов Р-гликопротеина (плуроники — полимеры, состоящие из блоков этилен- и пропиленоксидов (Kabanov et al., 2002; Demina et al., 2005; Жирнов и др., 2006)).

Накопление SkQR1 в резистентных и чувствительных сублиниях клеток MCF-7 и K562 изучали в присутствии и в отсутствие ингибиторов Р-гликопротеина. С этой целью клетки культивировали в среде, содержащей 50 нМ SkQR1, в течение 1.5—3 ч. В ряде опытов после этого SkQR1 отмывали и культивировали клетки 0.5—2 ч без SkQR1. Ингибиторы верапамил (50 мкМ) или плуроник L61 (30 мкг/мл) добавляли за 15—20 мин до введения SkQR1 и сохраняли в течение всего эксперимента (в том числе и после удаления SkQR1). Флуоресценцию измеряли, используя проточный цитофлуориметр FC 500 (Beckman Coulter, США).

Мембранный потенциал митохондрий сбрасывали разобщителем FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторометоксифенилгидразоном, Sigma, США) в концентрации 10 мкМ.

Накопление флуоресцирующих антиоксидантов исследовали с помощью метода UPLC с УФ- и МС/МС-детекцией. Анализ проводили методом UPLC/MS на хроматографе Waters Acquity с диодно-матричным УФ-детектором и tandemным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters). Условия анализа: объем пробы 11.2 мкл (полная петля); колонка 0.21×5.0 см Acuity UPLC VEN C18 (1.7 мкм); температура колонки 35 °C; градиент от 5 до 100 % ацетонитрила за 3 мин в присутствии 20 мМ муравьиной кислоты; скорость потока 0.5 мл/мин; УФ-детекция в диапазоне 200—500 нм; МС-детекция в режиме позитивных ионов; существенные параметры детектора: напряжение на капилляре +3 кВ; напряжение на конусе +55 В; температура капилляра 450 °C; температура источника 120 °C; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1000 ед.

Защитный эффект SkQ1 (10 нМ) и SkQR1 (20 нМ) при воздействиях, вызывающих окислительный стресс, изучали после предварительного культивирования клеток с антиоксидантами в течение определенного времени (28 ч или 6 сут (Saretzki et al., 2003)). В качестве индуктора окислительного стресса использовали пероксид водорода (100—400 мкМ, 20 ч). Долю апоптотических клеток определяли после 1-часовой обработки клеток флуоресцентным красителем Хёхстом 33342 (Hoechst 33342; Sigma, США), считая по 500 клеток в каждом из трех экспериментов. Количество выживших клеток оценивали по восстановлению 3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) с помощью ридера (Multiscan, Thermolabsystems) при длине волны 541 нм (Panne-

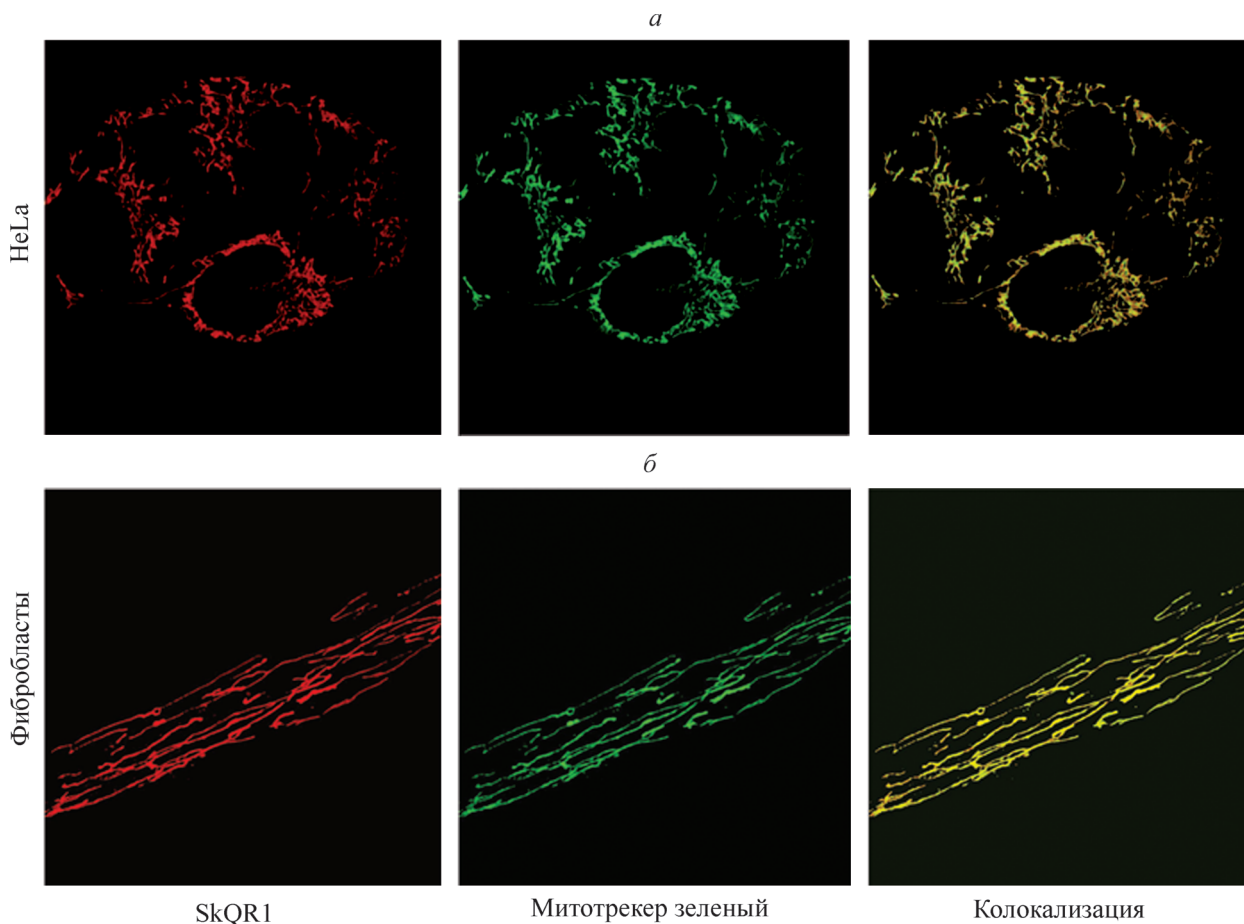


Рис. 2. Накопление SkQR1 в митохондриях эпителия карциномы шейки матки человека HeLa (а) и нормальных фибробластов кожи человека (б).

Клетки инкубировали с SkQR1 (50 нМ, 3 ч) и митотрекером зеленым (200 нМ, 15 мин), анализировали с помощью конфокального микроскопа. Колокализация красной флуоресценции SkQR1 и зеленой флуоресценции митотракера (желтый цвет) свидетельствует о накоплении SkQR1 внутри митохондрий.

couque et al., 2008). В экспериментах по определению восстановленного глутатиона (GSH) пероксид водорода использовали в концентрации 1 мМ.

Для определения концентрации GSH использовали реакцию восстановления ДТНБ (5,5'-ди-тио-бис-2-нитробензойной кислоты) по методу Гриффита (Griffith, 1985). Клетки K562 разрушали холодным раствором, содержащим 10 % HClO₄, 5 % Тритона X-100 и 5 мМ ЭДТА при соотношении объемов 1 : 1. Денатурированный белок осаждали при 4 °С. Супернатант добавляли в фосфатный буфер, содержащий 125 мМ фосфата натрия, 6 мМ ЭДТА, pH 7.5, и 6 мМ ДТНБ. GSH неэнзиматически восстанавливает ДТНБ до ТНБ (2-нитро-5-тиобензойной кислоты), концентрацию которой определяли спектрофотометрически при 412 нм. Для калибровки использовали стандартные растворы GSH.

Результаты и обсуждение

Накопление SkQR1 изучали в различных культивируемых клетках человека. Родамин 19, входящий в состав SkQR1, флуоресцирующий в красной области спектра, позволял отслеживать локализацию вещества в клеточных органеллах. Одновременное добавление SkQR1 (красного цвета) и митохондриального красителя мито-

трекера зеленого (зеленого цвета) к культурам клеток линии HeLa и к нормальным фибробластам человека приводило к окрашиванию одних и тех же органелл, что проявлялось в наложении красной и зеленой окрасок и появлению желтого цвета. Это свидетельствовало об одинаковой внутриклеточной локализации SkQR1 и митотракера зеленого (рис. 2), т. е. о накоплении SkQR1 внутри митохондрий. Последнее, по-видимому, обуславливалось тем, что митохондриальный матрикс является единственным отрицательно заряженным внутриклеточным компартментом. Добавление разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP, сбрасывающего мембранный потенциал, препятствовало накоплению антиоксиданта внутри митохондрий (рис. 3), что свидетельствовало об избирательном накоплении SkQR1 только внутри энергизованных митохондрий.

Накопление SkQR1 в клетках HeLa и его выход из клеток. Предварительно проведенный анализ методом UPLC клеточных экстрактов показал, что, кроме пика SkQR1, в клетке не накапливается других компонентов, имеющих поглощение в области 500 нм. На этом основании можно сделать вывод о том, что возможные продукты деградации SkQR1 не имеют поглощения в области 528 нм и, следовательно, не способны флуоресцировать подобно SkQR1. Клетки HeLa культивировали в присутствии SkQR1 (50 нМ) в течение 3 ч. Затем SkQR1

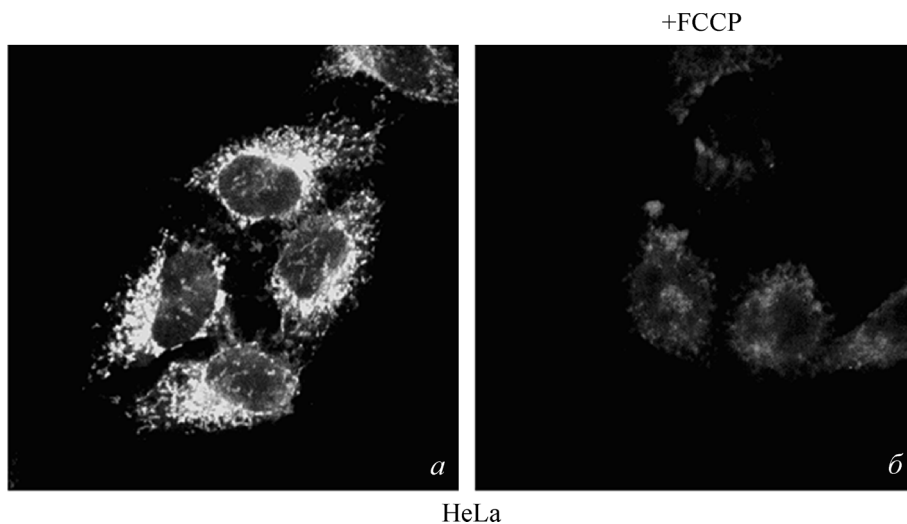


Рис. 3. Накопление SkQR1 в клетках HeLa в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP. *a* — накопление SkQR1 в клетках, культивируемых в присутствии SkQR1 (20 нМ) в течение 5 ч; *б* — FCCP (10 мкМ) добавлен за 1 ч до SkQR1.

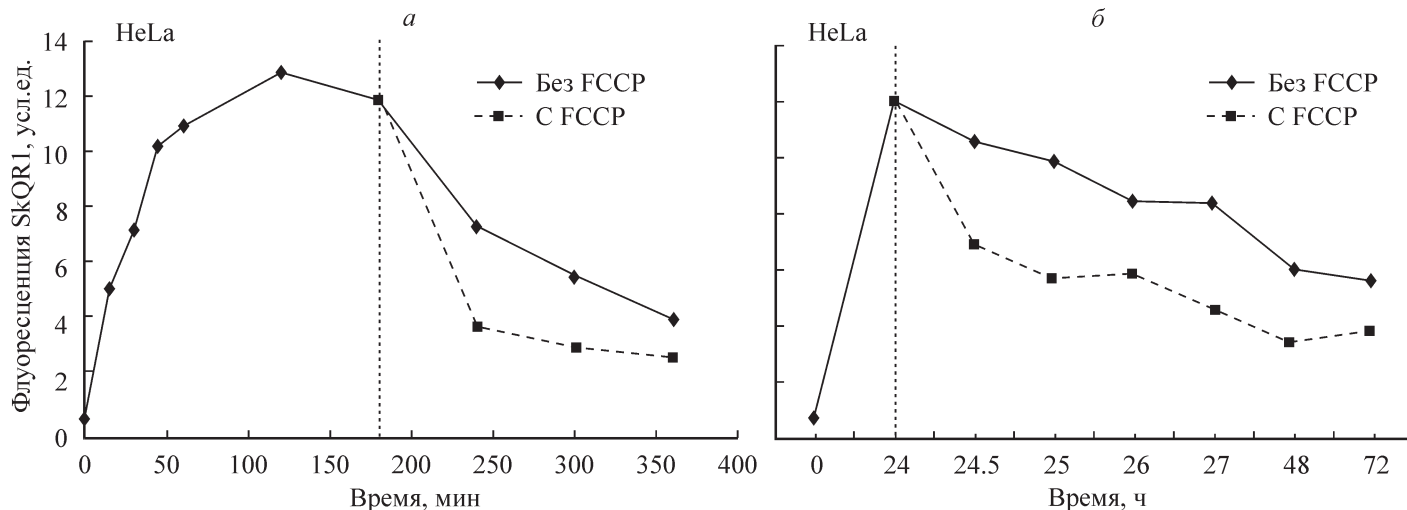


Рис. 4. Динамика накопления SkQR1 в клетках HeLa.

a — клетки HeLa культивировали в присутствии SkQR1 (50 нМ) в течение 3 ч, затем среду заменяли на среду, не содержащую SkQR1; *б* — кинетика выхода SkQR1 из клеток HeLa через 24 ч культивирования в присутствии SkQR1. В часть проб при отмывке был добавлен FCCP (10 мкМ).

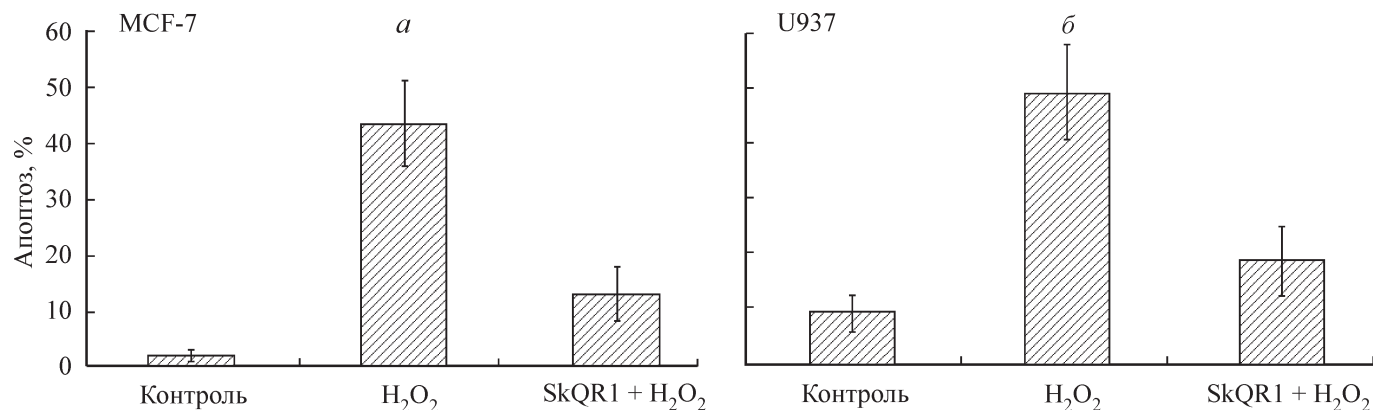


Рис. 5. Защита клеток антиоксидантом SkQR1 от окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода.

a — клетки карциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали в присутствии SkQR1 (20 нМ) в течение 28 ч; *б* — клетки лимфы человека U937 культивировали в присутствии SkQR1 (10 нМ) в течение 6 сут; в обоих случаях пероксид водорода (400 мкМ) добавляли на 20 ч после отмывки от SkQR1. Культивирование с антиоксидантом снижало долю апоптотических клеток, индуцированных пероксидом.

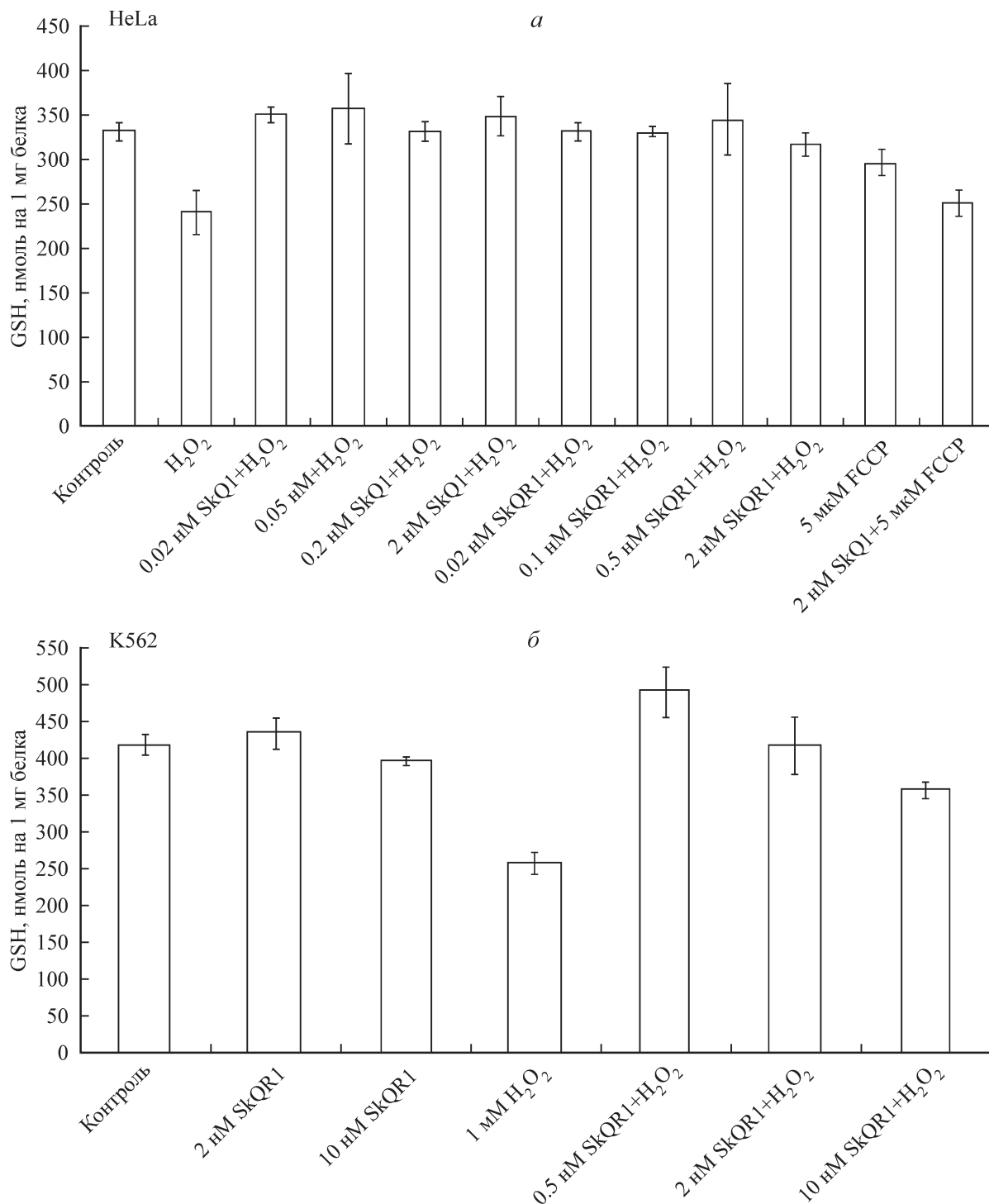


Рис. 6. Влияние SkQ на уровень восстановленного глутатиона (GSH) в клетках.

а — клетки HeLa, инкубация с SkQ1 и SkQR1; FCCP блокирует защитный эффект SkQ. б — клетки K562, культивирование в присутствии SkQR1. SkQ1 и SkQR1 добавляли на 4 ч, после чего клетки обрабатывали пероксидом водорода (1 мМ, 2 ч) и определяли уровень GSH. FCCP добавляли за 30 мин до введения SkQ.

удаляли сменой среды и культивировали клетки в среде без антиоксиданта, что приводило к медленному выходу SkQR1 из клеток. На графике (рис. 4, а) можно видеть, что накопление SkQR1 в клетках происходило в течение примерно 1 ч, после чего кривая флуоресценции выходила на плато. При этом кинетика накопления не зависела от концентрации антиоксиданта. (На рисунке приведены данные только для одной концентрации SkQR1 (50 нМ).

Данные для других концентраций не приведены. Разобщитель дыхания FCCP стимулировал выход вещества из клеток, ранее инкубированных с SkQR1 (рис. 4, б).

Защита клеток от окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода. Перед добавлением пероксида водорода клетки линий MCF-7 и U937 культивировали в присутствии SkQR1 в течение определенного времени (от 28 ч до 6 сут), что приводило

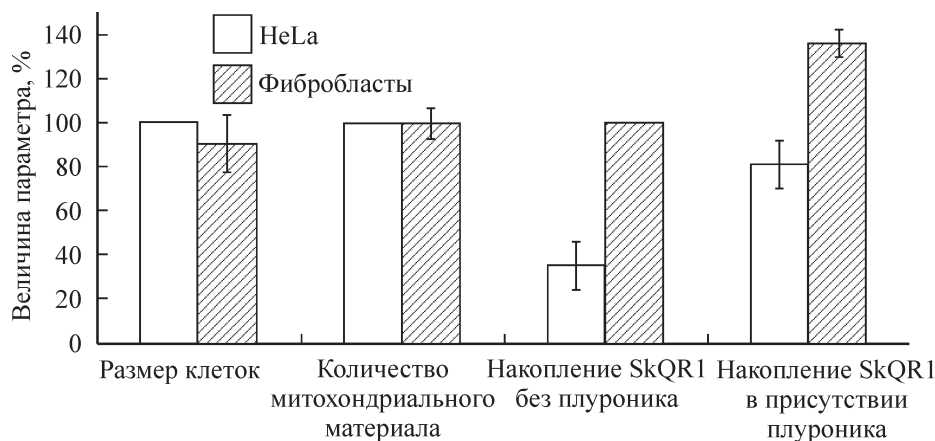


Рис. 7. Сравнение накопления SkQR1 в клетках HeLa и в нормальных фибробластах кожи человека.

Относительные размеры клеток определяли по светорассеиванию на проточном цитофлуориметре. Содержание митохондрий определяли по суммарной флуоресценции митотракера зеленого на 1 клетку. В указанных пробах накопление SkQR1 измеряли в присутствии ингибитора множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) плуроника L61 (5 мкг/мл). Приведены данные одного эксперимента с одновременным обчетом различных показателей. Демонстрация на одной диаграмме обусловила необходимость принятия за 100 % трех разных параметров. Размер клеток и количество митохондриального материала в клетках HeLa и накопление SkQR1 в фибробластах человека (без плуроника L61) приняты за 100 %. Доверительные интервалы в них равны нулю.

к защите клеток от апоптогенного действия пероксида водорода. На рис. 5 можно видеть, что культивирование с антиоксидантом снижает количество апоптотических клеток, индуцированных пероксидом.

Влияние антиоксидантов на уровень GSH при окислительном стрессе. GSH, один из основных внутриклеточных антиоксидантов, определяли в клетках HeLa и в клетках эритролейкемии человека K562. Добавление пероксида водорода приводило к снижению уровня GSH, что указывало на развитие окислительного стресса (Schulz et al., 2000). SkQ и SkQR1 в очень низких концентрациях (0.5 нМ) предотвращали окисление GSH. FCCP блокировал защитный эффект SkQ (рис. 6).

Влияние ингибиторов Р-гликопротеина (Pgp) на накопление митохондриальнонаправленных антиоксидантов. При изучении внутриклеточного накопления SkQR1 было обнаружено, что клетки HeLa аккумулируют в 2–3 раза меньше SkQR1, чем нормальные фибробласты кожи человека (рис. 7). Это не было связано ни с размером клеток, ни с количеством митохондрий, так как прямые измерения показали, что клетки обоих типов были близки по размеру и содержали равное количество митохондрий (рис. 7). Поскольку

феномен МЛУ является характерным для многих опухолевых клеток, одной из причин различия в накоплении SkQR1 могло оказаться его откачивание из клеток HeLa посредством Pgp. Действительно, добавление ингибиторов (верапамила или плуроника L61) наиболее распространенной изоформы Pgp 170 приводило к увеличению накопления SkQR1 в клетках HeLa почти до уровня его накопления фибробластами (рис. 7, 8). По-видимому, Pgp 170 экспрессируется в клетках HeLa, как и во многих других опухолевых клетках. Небольшое увеличение накопления SkQR1 после добавления ингибиторов наблюдали также и в культурах нормальных фибробластов кожи человека (рис. 7, 8). Экспрессия фибробластами кожи человека специфических транспортных белков, ассоциированных с МЛУ, является хорошо известным феноменом и связана с участием этих клеток в воспалительных реакциях кожи (Dreuw et al., 2005). Ингибирование этих белков приводило не только к резкому повышению чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам, но также и к ослаблению воспалительных реакций организма. Последнее, вероятно, связано с тем, что ряд членов семейства транспортеров МЛУ имеет отношение к секреции лейкотриенов и простагландинов (Dreuw et al., 2005).

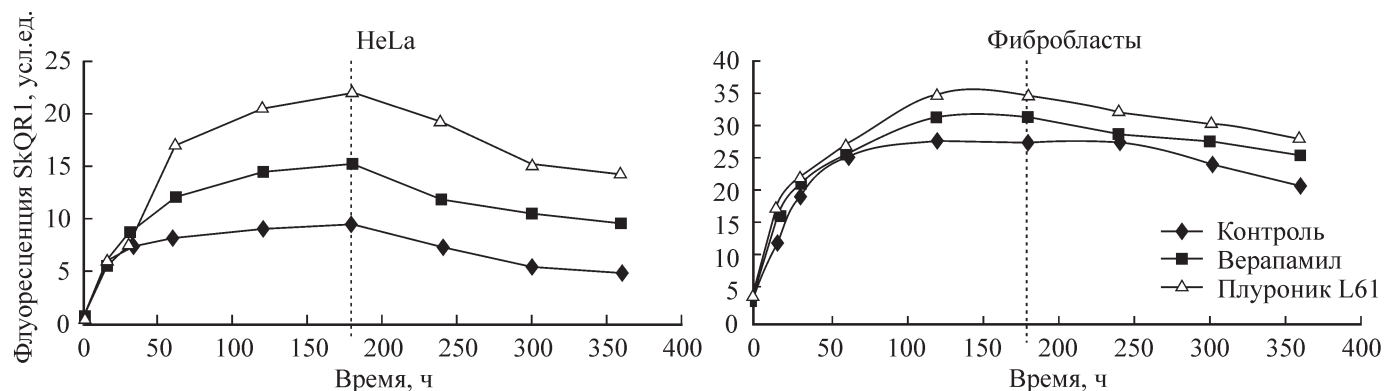


Рис. 8. Влияние ингибиторов МЛУ на накопление SkQR1 в клетках HeLa и в нормальных фибробластах кожи человека.

Клетки инкубировали с SkQR1 (50 нМ) в течение 3 ч. Верапамил (50 мкМ) и плуроник L61 (5 мкг/мл) добавляли за 1 ч до введения SkQR1 и повторно после отмывки от SkQR1. Уровень накопления SkQR1 оценивали по интенсивности флуоресценции, используя проточный цитофлуориметр.

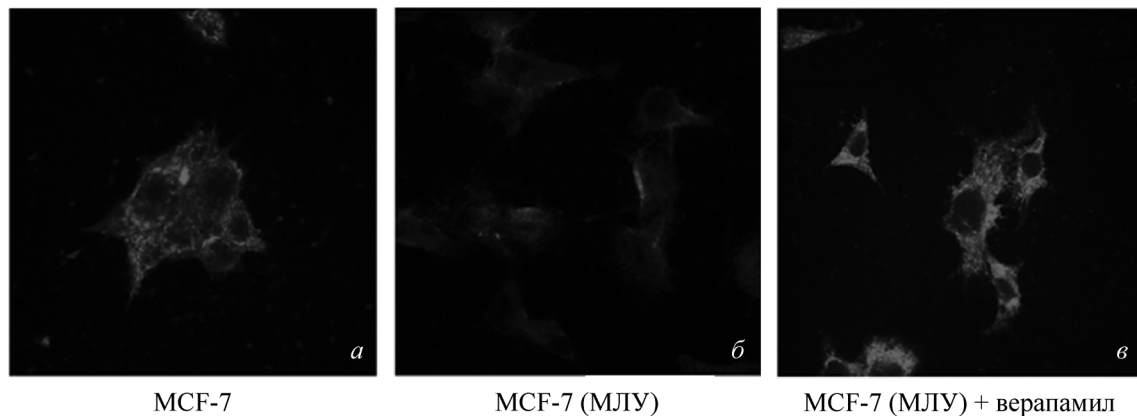


Рис. 9. Накопление SkQR1 в клетках различных сублиний эпителия рака молочной железы человека MCF-7. Конфокальная микроскопия.

a, б — чувствительная и резистентная сублинии соответственно; клетки инкубировали с SkQR1 (20 нМ) в течение 3 ч, накопление SkQR1 в резистентных сублиниях практически отсутствует. *в* — резистентная сублиния в присутствии 50 мкМ верапамила (аккумуляция SkQR1).

Для подтверждения того, что SkQR1 действительно выводится из клеток посредством Pgp, было проведено изучение накопления SkQR1 клетками карциномы молочной железы человека MCF-7 и эритролейкемии человека K562, обладающими очень высокой МЛУ. Каждая из этих культур была представлена двумя сублиниями клеток — чувствительной и резистентной. Ранее резистентные сублинии MCF-7 и K562 были протестированы на экспрессию в них Pgp. Мелик-Нубаровым и Деминой показано (Демина, 2007), что в резистентных сублиниях клеток MCF-7 и K562 именно функционирование Pgp является преобладающим механизмом МЛУ. Для подавления МЛУ были использованы ингибиторы Pgp верапамил и плуроник L61. SkQR1 в концентрации 20 нМ добавляли к резистентным и чувствительным сублиниям клеток в присутствии и в отсутствие ингибиторов Pgp с последующим изучением клеток с помощью конфокального микроскопа.

Накопление SkQR1 (20 нМ, 3 ч) в чувствительных сублиниях MCF-7 и K562 значительно превышало его накопление в резистентных сублиниях, в которых SkQR1 практически отсутствовал. Добавление ингибиторов Pgp приводило к аккумуляции SkQR1 клетками резистентных сублиний (рис. 9, 10). Таким образом, на качественном уровне было показано Pgp-опосредованное откачивание SkQR1 из резистентных клеток, обладающих МЛУ. Даль-

нейшие эксперименты были направлены на количественную оценку накопления SkQR1 в таких клетках. Для этой цели был использован метод проточной цитофлуометрии. Было поставлено два типа экспериментов. В экспериментах первого типа клетки 3—4 ч культивировали в среде, содержащей SkQR1 (50 нМ), в присутствии или в отсутствие верапамила (50 мкМ), после чего определяли содержание SkQR1 в клетках. Чтобы разобщить поступление SkQR1 в клетки и его откачивание из клеток, ставили эксперименты второго типа, в которых антиоксидант отмывали. Сначала клетки культивировали 1 ч в присутствии SkQR1 и верапамила. Затем SkQR1 удаляли, сохраняя верапамил в среде, чтобы не вызвать откачивания накопленного антиоксиданта, и выдерживали клетки еще 30—60 мин, после чего определяли содержание SkQR1 в клетках. В обоих случаях проявлялось ярко выраженное отличие в накоплении SkQR1 резистентных клеток от чувствительных. На рис. 11 видно, что накопление SkQR1 в резистентных сублиниях K562 и MCF-7 было сравнительно слабым. Уровень накопления SkQR1 в чувствительных сублиниях клеток значительно превышал его уровень в резистентных и не менялся при добавлении ингибиторов Pgp. Добавление ингибиторов Pgp к резистентным сублиниям клеток увеличивало накопление SkQR1 в этих клетках до уровня его накопления в чувствительных сублиниях.

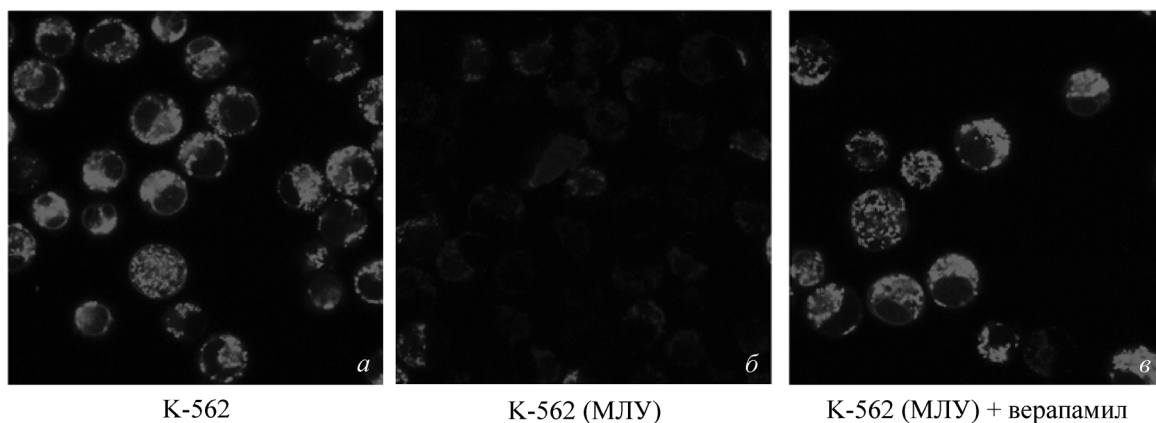


Рис. 10. Накопление SkQR1 в различных сублиниях эритролейкемии K562. Конфокальная микроскопия.

Клетки инкубировали с SkQR1 (20 нМ) в течение 3 ч. *a—в* — то же, что и на рис. 9.

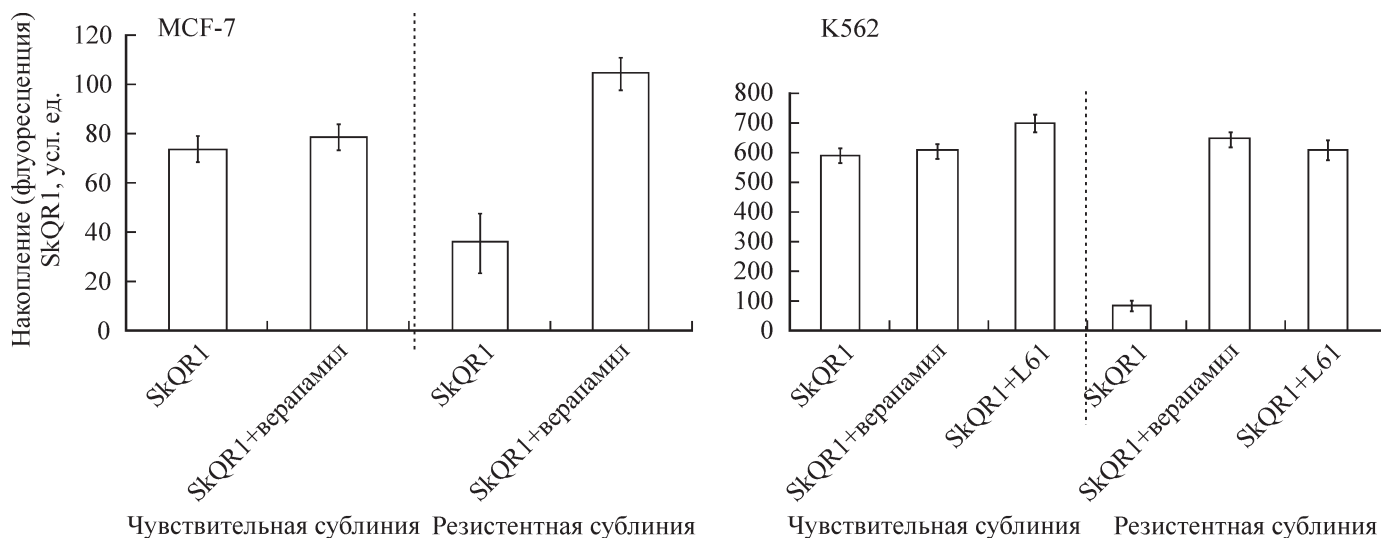


Рис. 11. Накопление SkQR1 клетками MCF-7 и K562. Данные проточной цитофлуориметрии.

Ингибиторы Р-гликопротеина верапамил (50 мкМ) и плуроник L61 (5 мкг/мл) добавляли за 1 ч до SkQR1. Накопление SkQR1 измеряли в течение 3.5 ч. Добавление ингибиторов приводило к аккумуляции SkQR1 клетками резистентных сублиний.

В резистентных сублиниях клеток MCF-7 накопление SkQR1 в отсутствие верапамила было снижено по сравнению с его накоплением в присутствии верапамила в экспериментах первого и второго типов в 3 и 9 раз соответственно, а в резистентных сублиниях K562 — соответственно в 7 и 10 раз.

Чтобы оценить уровень МЛЮ при накоплении SkQR1, мы сравнили его с накоплением родамина 6G, который является классическим агентом для тестирования МЛЮ. Родамин 6G добавляли в той же концентрации, что и SkQR1 (50 нМ), к чувствительным и резистентным клеткам K562 на 3 ч в присутствии и в отсутствие верапамила. Отметим 30-кратное увеличение накопления родамина 6G резистентными клетками после добавления верапамила (рис. 12, а). Аналогичные данные были получены для клеток HeLa при добавлении TMRM (50 нМ) — другого соединения, содержащего родамин 6G (рис. 12, б). Во всех случаях добавление разобщителя окислительного

фосфорилирования FCCP препятствовало аккумуляции родаминсодержащего соединения благодаря снижению мембранного потенциала.

Таким образом, в результате проведенных исследований на клетках HeLa и клетках двух резистентных сублиний — K562 и MCF-7, обладающих высокой МЛЮ, можно считать доказанным, что соединения семейства SkQ могут выводиться из резистентных клеток в окружающую среду посредством мультилекарственного транспортера Pgp 170.

Из-за отсутствия накопления SkQR1 в митохондриях резистентных клеток его добавление не приводило к защите клеток от окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. В отличие от резистентных клеток K562, в чувствительных клетках низкие концентрации SkQR1 (20 нМ) снижали токсичность пероксида водорода, повышая выживаемость клеток (рис. 13), которую оценивали по МТТ-тесту. Использование малотоксичного

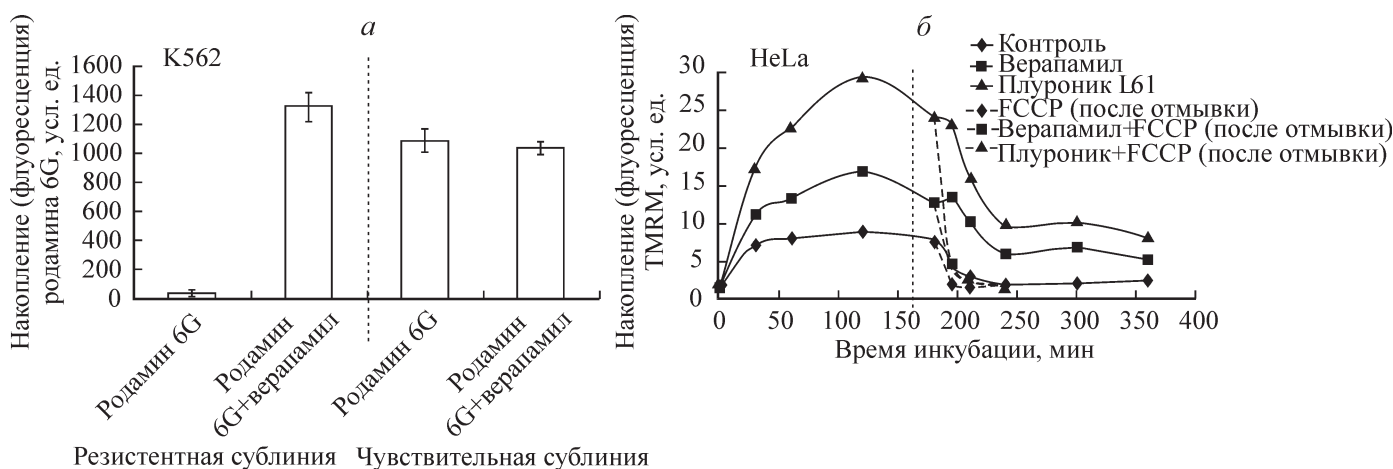


Рис. 12. Накопление родаминов клетками K562 (а) и HeLa (б). Данные проточной цитофлуориметрии.

а — накопление родамина 6G (50 нМ) в различных сублиниях клеток K562 измеряли в течение 4 ч, концентрация верапамила 50 мкМ; б — кинетика накопления TMRM (50 нМ) в клетках HeLa. Клетки инкубировали с SkQR1 (50 нМ) в течение 3 ч. Верапамил и плуроник L61 (5 мкг/мл) добавляли за 1 ч до введения SkQR1 и повторно после отмывки от SkQR1; там, где указано, FCCP (10 мкМ) добавляли при отмывке от TMRM.

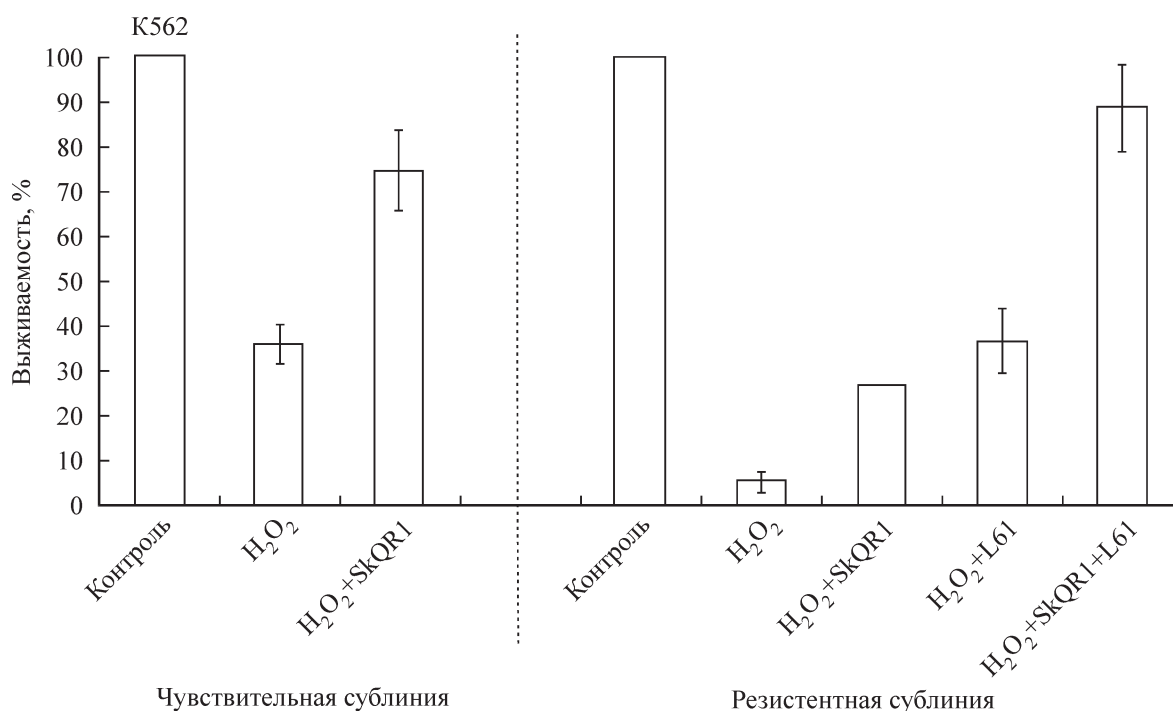


Рис. 13. Различная эффективность SkQR1 в защите различных сублиний клеток K562 от токсического действия пероксида водорода.

Клетки культивировали в присутствии 20 нМ SkQR1 в течение 6 сут, после чего SkQR1 отмывали и на 20 ч добавляли 0.1 или 0.3 мМ пероксида водорода к чувствительным или к резистентным клеткам соответственно. Долю выживших клеток оценивали по МТТ-тесту. Там, где указано, плуроник L61 (5 мкМ) присутствовал в течение всего эксперимента.

ингибитора Pgp плуроника L61 дало возможность ингибировать МЛЮ не только при кратковременном, но и при многодневном культивировании клеток с SkQR1. Культивирование резистентных клеток с SkQR1 в присутствии плуроника L61 предотвращало откачку SkQR1 из этих клеток, благодаря чему SkQR1 защищал резистентные клетки от токсического действия пероксида водорода, повышая их выживаемость (по МТТ-тесту) (рис. 13).

Хорошо известно, что химиотерапевтические антиопухолевые препараты часто выводятся из малигнизированных клеток с помощью мультилекарственных транспортеров (Van der Bliek, Borst, 1989), что является серьезным препятствием на пути лечения злокачественных новообразований. Тем не менее существует целый ряд терапевтических агентов, не имеющих отношения к МЛЮ. Это разного рода облучения, физико-химические воздействия, некоторые химические вещества (цисплатин и др.). В основе действия многих из них лежат образование активных форм кислорода и индукция окислительного стресса. В идеале противоопухолевые препараты должны были бы разрушать только злокачественные клетки, не оказывая негативного влияния на нормальные ткани. Однако огромное большинство цитостатиков не обладает специфичностью действия и кроме опухолевых клеток поражает также и нормальные ткани организма. Создание новых препаратов и интенсификация режимов цитостатической терапии, повышая эффективность лечения, одновременно увеличивают его токсичность. Многочисленные, но не имеющие значительного успеха исследования направлены на поиск агентов, не влияющих на эффективность химиотерапии, но снимающих ее токсическое воздействие на нормальные ткани. В свете этого перспективной видится возможность использования в интересах

большого присущее опухолевым клеткам свойство МЛЮ, обычно рассматриваемое как серьезное препятствие на пути лечения рака. При противоопухолевой терапии (подобранной по «нечувствительности» к МЛЮ) митохондриально-адресованные антиоксиданты будут выводиться из опухолевых клеток и не будут препятствовать эффективности антираковой терапии. В то же время, сохраняясь в нормальных тканях, не обладающих МЛЮ, антиоксиданты уменьшат повреждающее действие терапии и защитят от нее обычные (немалигнизированные) клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01165).

Список литературы

- Антоненко Ю. Н., Аветисян А. В., Бакеева Л. Е., 2008. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование in vitro. Биохимия. 73 (12) : 1589—1606.
- Демина Т. В. 2007. Взаимодействие амфифильных полимеров с природными и модельными липидными мембранами: Автореф. канд. дис. М. 20 с.
- Жирнов А. Е., Павлов Д. Н., Демина Т. В., Бадун Г. А., Гроздова И. Д., Мелик-Нубаров Н. С. 2006. Влияние строения блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида на их взаимодействие с биологическими мембранами. Высокомолекулярные соединения. Сер. А. 48 (11) : 1—11.
- Нейфах А. А. 2003. Множественная лекарственная устойчивость: решение проблемы? Биол. мембр. 20 (3) : 206—212.

- Скулачев В. П. 2007. Попытка биохимиков атаковать проблеме старения: «Мегапроект» — по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы. Биохимия. 72 (12) : 1700—1714.
- Стасовская А. А. 2000. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Биохимия. 65(1) : 112—126.
- Ambudukar S. V., Dey S., Hrycina C. A., Ramachandra M., Gottesman M. M. 1999. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39 : 361—398.
- Bakeeva L. E., Grinius L. I., Jasaitis A. A., Kuliene V. V., Levitsky D. O., Liberman E. A., Severina I. I., Skulachev V. P. 1970. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria. Biochim. biophys. acta. 216 : 12—21.
- Carmichael J., De Graff W.G., Gazdar A.F., Minna D., Mitchell J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47 : 936—942.
- Demina T., Grosdova I., Krylova O., Zhirnov V., Frey H., Kaluz H., Melik-Nubarov N. 2005. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. Biochemistry. 44 : 4042—4054.
- Dreuw A., Hermanns H. M., Heise R., Jousen S., Rodriguez F., Marquardt Y., Jugert F., Merk H. F., Heinrich P. C., Baron J. M. 2005. Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 124 : 28—3—7.
- Fetisova E. K., Avetisyan A. V., Izumov D. S., Korotetskaya M. V., Chernyak B. V., Skulachev V. P. 2010. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 selectively protects MDR (Pgp170)-negative cells against oxidative stress. FEBS Lett. 584 : 562—566.
- Griffith O. W. 1985. Glutathione and glutathione disulphide. In: Methods of enzymatic analysis. 3rd ed. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft. 8 : 521—529.
- Higgins C. F., Gottesman M. M. 1992. Is the multidrug transporter a flipase? Trends Biochem. Sci. 17 : 18—21.
- Kabanov A. V., Batrakova E. V., Alakhov V. V. 2002. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. Adv. Drug Deliv. Rev. 54 : 759—779.
- Kalinina E. V., Chernov N. N., Saprin A. N., Kotova Y. N., Andreev Y. A., Solomka V. S., Schertbak N. P. 2006. Changes in expression of genes encoding antioxidant enzymes, heme oxygenase-1, Bcl-2, and Bcl-x1 and level of reactive oxygen species in tumor cells resistant to doxorubicin. Biochemistry. 71 : 1200—1206.
- Kelso G. F., Porteous C. M., Hughes G., Ledgerwood E. C., Gane A. M., Smith R. A., Murphy M. P. 2002. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. Ann. N. Y. Acad. Sci. 959 : 263—274.
- Lewis K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. Trends Biochem. Sci. 19 : 119—123.
- Liberman E. A., Skulachev V. P. 1970. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion. Biochim. biophys. acta. 216 : 30—42.
- Liberman E. A., Topali V. P., Tsofina L. M., Jasaitis A. A., Skulachev V. P. 1969. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. Nature. 222 : 1076—1078.
- Murphy M. P., Smith R. A. 2007. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47 : 629—656.
- Ng W. W., Sarangi F., Zastawny R. L., Veinot-Drebot L., Ling V. 1989. Identification of members of the P-glycoprotein, multigene family. Mol. Cell. Biol. 9 : 1224—1232.
- Pannecouque C., Daelemans D., De Clercq E. 2008. Tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of HIV replication inhibitors: revisited 20 years later. Nature Protocols. 3 : 427—434.
- Safa A. R. 1988. Photoaffinity labeling of the multidrug-resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85 : 7187—7191.
- Saretzki G., Murphy M. P., von Zglinicki T. 2003. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. Aging Cell. 2 : 141—143.
- Schulz J. B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur. J. Biochem. 267 : 4904—4911.
- Tsuruo T., Yusa K. 1989. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. Cancer Res. 49 : 5002—5006.
- Van der Bliek A. M., Borst P. 1989. Multidrug resistance. Adv. Cancer Res. 52 : 165—198.

Поступила 30 IV 2010

MULTIDRUG RESISTANCE P-GLYCOPROTEIN INHIBITS THE ANTIAPOPTOTIC ACTION OF MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SkQR1

E. K. Fetisova,¹ A. V. Avetisyan, D. S. Izumov, M. V. Korotetskaya, V. N. Tashlitsky, V. P. Skulachev, B. V. Chernyak

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Moscow State University; e-mail: fetis@belozersky.msu.ru

Mitochondria-targeted antioxidants of the SkQR1 family, being accumulated in energized mitochondria, protect cells from oxidative stress by increasing the level of reduced glutathione and decreasing the cell-damaging effect induced by hydrogen peroxide. Using various human transformed cell lines and SkQR1 (a fluorescent member of the SkQ family), we show that SkQR1 is ejected from chemotherapy-resistant cells by P-glycoprotein — one of the main transport proteins determining multidrug resistance typical for many neoplastic cells. It is also shown that SkQR1 ejection is neutralized by P-glycoprotein inhibitors (verapamil and pluronic L61). In experiments on K562 cells, it was found that the subline sensitive to chemotherapy is protected by SkQR1 from apoptotic action of hydrogen peroxide. Protection of the resistant subline occurs only after inhibition of P-glycoprotein.

Key words: mitochondrion, antioxidants, oxidative stress, multidrug resistance, P-glycoprotein, SkQ.