



ПАНЧУК

Ростислав Русланович — доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України

ПРОТИПУХЛИННІ ПРЕПАРАТИ ПОДВІЙНОЇ ДІЇ ДЛЯ ПОДОЛАННЯ НАБУТОЇ СТІЙКОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ДО ХІМІОТЕРАПІЇ

За матеріалами наукового повідомлення на засіданні Президії НАН України 22 грудня 2021 року

Проведено дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі унікальної здатності ангуциклінових антибіотиків родини ландоміцинів долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, зумовлену різними чинниками. Показано, що цей феномен ґрунтується на ранній індукції пероксиду водню у злоякісних клітинах без участі мітохондрій і специфічному зв'язуванні цих антибіотиків з клітинними тіолами. Оскільки стійкість до хіміотерапії, як правило, асоційована зі зростанням клітинного рівня глутатіону, підвищена афінність ландоміцинів до тіолів може пояснити вибірковість їх дії на злоякісні клітини, резистентні до ліків.

Ключові слова: стійкість пухлин до ліків, активні форми кисню, тіоли, ландоміцини, апоптоз.

Найбільшим недоліком сучасної хіміотерапії раку є вкрай обмежений ефект від застосування найсучасніших хіміотерапевтичних засобів на загальну тривалість життя онкохворих. Зокрема, в період з 1975 по 2009 р. коефіцієнти смертності від усіх онкозахворювань у чоловіків та жінок усіх вікових та расових груп знизилися лише на 13 % [1], а поява на фармацевтичному ринку надзвичайно складних і високоартісних моноклональних антитіл та інгібіторів кіназ привела до збільшення середнього часу виживання хворих на рак усього на 2–5 % порівняно з традиційною хіміотерапією [2].

Цьому є кілька причин — фундаментальні недоліки дизайну новітніх протипухлинних засобів (багато з них є зворотними інгібіторами специфічних онкобілків і лише пригнічують ріст злоякісних клітин, але не вбивають їх), надзвичайно швидкий розвиток резистентності до традиційних і таргетних ліків, що пов'язаний із цілою низкою змін у геномі та протеомі пухлин.

Саме тому першочерговим завданням сучасної онкології є розроблення нової парадигми терапії онкозахворювань, стійких до ліків, яка має враховувати і використовувати універсальні вразливості дисемінованих злоякісних клітин.

Однією з таких фундаментальних уразливостей злоякісних клітин є явище «перемонтованого редокс-стану» [3], яке характеризується здатністю виживати та підтримувати високу проліферативну активність за підвищеного рівня активних форм кисню (АФК) та антиоксидантних білків. Основною причиною цього феномену є порушення мітохондріальної активності в пухлинних клітинах [4], тому аніони супероксиду ($O_2^{\cdot-}$), що продукуються мітохондріями, часто називають онкогенними АФК, оскільки вони підтримують виживання клітин та сприяють онкогенезу. Показано, що надпродукція супероксид-аніона у злоякісних клітинах призводить до інгібування сигнальних шляхів клітинної смерті внаслідок надекспресії антиапоптичного білка cFLIP [5]. Проте основна маса наявних нині протипухлинних засобів з прооксидантною активністю (наприклад, доксорубіцин, паклітаксел, мітоміцин С) реалізують свій протипухлинний потенціал саме через ураження мітохондрій і, відповідно, надпродукцію $O_2^{\cdot-}$ [6]. Це істотно знижує терапевтичний потенціал цих препаратів і спричиняє численні побічні ефекти щодо нормальних тканин організму, насамперед кардіоміоцитів і нефронів [7]. Крім того, абсолютна більшість цих прооксидантних засобів є субстратами білків — транспортерів ліків, а тому пухлинні клітини швидко набувають стійкості до них [8].

На відміну від супероксид-аніонів, пероксид водню не має онкогенних властивостей, а у високих концентраціях, навпаки, може індукувати загибель злоякісних клітин [9]. Ще однією точкою прикладання сили редокс-спрямованих протипухлинних препаратів є клітинна система глутатіону, що характеризується підвищеною активністю при перемонтованому редокс-стані [10]. Тому поєднання H_2O_2 -індуцибельної та тіолтаргетної активностей є однією з найбільш бажаних характеристик ре-

докс-спрямованих ліків нового покоління. Це дозволило б знизити їхню токсичність щодо нормальних тканин, які характеризуються низьким рівнем як АФК, так і антиоксидантних білків, і водночас скеровувало б ці ліки до пухлини та її метастазів, де ці показники значно вищі [11].

Частково такі характеристики мають деякі природні сполуки, які містять у своїй структурі фрагменти хінону, зокрема менадїон (2-метил-1,4-нафтохінон) — похідне вітаміну К [12]. Завдяки незначній молекулярній масі (172 кДа) менадїон не розпізнається білками — транспортерами ліків, що дозволяє цьому препарату долати стійкість пухлин до хіміотерапії, викликану надекспресією Р-глікопротеїну/MRP-1/bsр. Індукція апоптозу під дією менадїону супроводжується потужним оксидативним стресом, який, однак, має як цитозольне (H_2O_2), так і мітохондріальне ($O_2^{\cdot-}$) походження [13].

Така різноспрямована природа АФК, очевидно, і є причиною недостатньої селективності дії менадїону в клінічних дослідженнях і призводить до геморагічної анемії у пацієнтів [14]. Це стосується будь-якого використання цього хінону в лікуванні раку. Тому пошук поліпшеного аналога менадїону, який характеризувався б вищим протипухлинним потенціалом і ширшим терапевтичним вікном, залишається актуальним завданням клінічної онкології.

Ландоміцинові антибіотики родини ангуциклінів, що містять аналогічний *para*-хіноновий фрагмент, є надзвичайно перспективними кандидатами на цю роль. Раніше ми продемонстрували, що ландоміцин Е (LE), який характеризується наявністю трьох дидезоксицукрів у олігосахаридному ланцюзі, легко долає стійкість злоякісних клітин як до традиційної, так і до таргетної хіміотерапії [15–17]. Однак механізми, які визначають унікальну протипухлинну активність ландоміцинів, донедавна залишалися недостатньо вивченими.

Ідентифікація внутрішньоклітинних мішеней ландоміцинів, задіяних у генерації пероксиду водню. В літературі описано випадки,

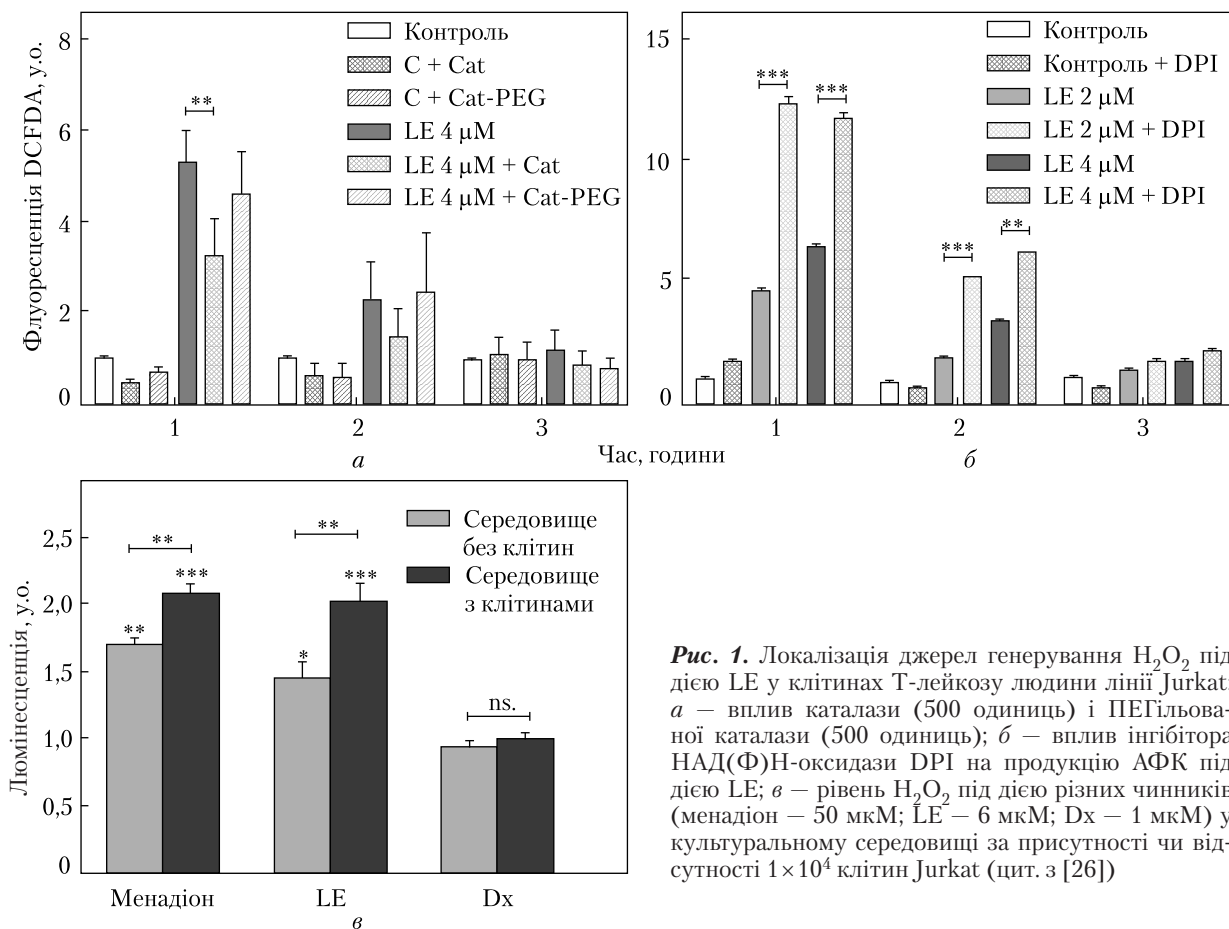


Рис. 1. Локалізація джерел генерування H_2O_2 під дією LE у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat: *a* – вплив каталази (500 одиниць) і ПЕГільованої каталази (500 одиниць); *б* – вплив інгібітора НАД(Ф)Н-оксидази DPI на продукцію АФК під дією LE; *в* – рівень H_2O_2 під дією різних чинників (менадїон – 50 мкМ; LE – 6 мкМ; Dх – 1 мкМ) у культуральному середовищі за присутності чи відсутності 1×10^4 клітин Jurkat (цит. з [26])

коли протипухлинні препарати здатні самостійно генерувати АФК унаслідок особливостей їхньої хімічної структури. Для перевірки цієї гіпотези ми використали тест ROS-Glo H_2O_2 , який дозволяє вимірювати кількість пероксиду водню в позаклітинному середовищі. Як позитивний контроль брали хінон менадїон (вітамін K_3), а АФК-індуцибельну активність LE порівнювали з доксорубіцином (Dх), який також містить хінонові цикли у своїй молекулі.

Показано (рис. 1), що і ландоміцин E, і менадїон спричиняли зростання кількості пероксиду водню у безклітинному середовищі, проте у присутності клітин рівень H_2O_2 був значно вищим, особливо у випадку LE. Доксорубіцин не спричиняв зростання рівня пероксиду водню ні в умовах середовища без клітин, ні за їх присутності. Отже, процес LE-індукованої генерації

АФК не є спонтанним і потребує певних клітинних ензимів, задіяних у метаболізмі АФК.

Відомо, що каталаза є надто великим ферментом (60 кДа), щоб потрапити у клітину шляхом дифузії, тому вона здатна захищати лише від зовнішньоклітинних АФК. Для ідентифікації клітинних компартментів, де відбувається генерація АФК під дією LE, ми використали немодифіковану каталазу та її кон'югат з поліетиленгліколом (ПЕГ), який здатен проникати всередину клітини. Цікаво, що протективний ефект ПЕГільованої каталази був навіть нижчим, ніж зовнішньоклітинної (рис. 1). Це вказує на те, що основне джерело пероксиду водню, який утворюється під впливом досліджуваного антибіотика, перебуває зовні клітини або безпосередньо поруч з клітинною мембраною.

Основними ензимами, які розміщені тут і можуть відповідати за продукцію H_2O_2 , є мембранозв'язані НАД(Ф)Н-оксидази [18]. Проте попередня інкубація клітин лінії Jurkat з тотальним інгібітором флавоензимів DPI (дифенілен іодоній) спричиняла ще більше зростання H_2O_2 порівняно з LE (рис. 1). Отже, можна зробити висновок, що внутрішньоклітинні НАД(Ф)Н-оксидази, NO-синтази, ксантиоксидази та цитохром P450 редуктази не беруть участі в цьому процесі.

Однак у цитозолі клітини є ще кілька білків, задіяних у відновленні хінонвмісних сполук: НАДФ-дегідрогенази NQO1 та NQO2 [19–21]. Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили вплив специфічних інгібіторів NQO1 (дикумарол) та NQO2 (кверцетин) на цитотоксичну активність ландоміцину А (LA) щодо клітин Т-лейкозу людини лінії Jurkat *in vitro* (рис. 2). LA, на відміну від LE, характеризується наявністю шести залишків дидезоксицукрів у олігосахаридному ланцюзі, що істотно посилює його цитотоксичну активність щодо злоскісних клітин [22, 23]. Показано, що кверцетин у низькій дозі (5 мкМ) проявляв виражений цитопротективний ефект щодо LA (збільшення кількості живих клітин на 30 %), тоді як у вищій дозі (10 мкМ) його поєднання з LA було вже токсичним для клітин. На відміну від нього, дикумарол проявляв виражену концентраційнозалежну цитопротективну активність, яка досягала максимуму за дози 25 мкМ цього модулятора (рис. 2). Однак найпотужніший цитопротекторний ефект проявляв менадіон, який у низьких концентраціях (10 мкМ) приводив до інгібування цитотоксичної активності LA на 75 %.

Щоб пересвідчитися, що результати аналізу на цитотоксичність корелюють з відповідним впливом цих сполук на АФК, ми дослідили вплив дикумаролу, кверцетину та менадіону на рівень пероксиду водню у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat за дії LA (див. табл.). Показано, що дикумарол (інгібітор NQO1) дозозалежно пригнічував продукцію АФК під дією ландоміцину А, і за його концентрації 10 мкМ рівень H_2O_2 знижувався на 30 %. Кверцетин (ін-

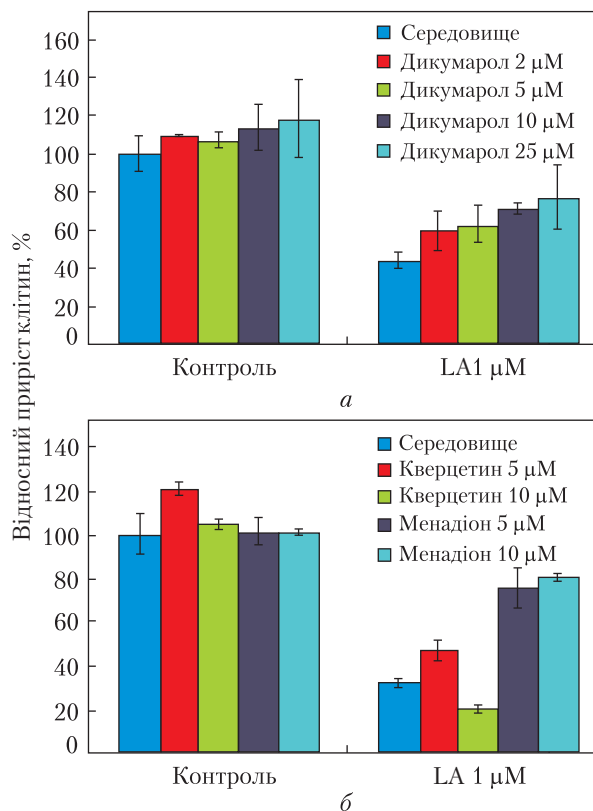


Рис. 2. Вплив дикумаролу (а), кверцетину та менадіону (б) на цитотоксичну активність ландоміцину А щодо клітин Т-лейкозу людини лінії Jurkat (фарбування трипановим синім, 24 год інкубації)

гібітор NQO2) у дозі 5 мкМ знижував продукцію H_2O_2 на 25 %, однак у вищій концентрації (10 мкМ), яка вже була токсичною для клітин, знову підвищував цей показник (див. табл.).

На відміну від обох інгібіторів НАД(Ф)-дегідрогеназ, менадіон приводив до потужного (у 2,2 раза) пригнічення продукції пероксиду водню під дією LA. Таку виражену дію менадіону можна пояснити конкурентним інгібуванням зв'язування ландоміцинів з активними центрами NQO1 та NQO2 завдяки більшій афінності менадіону до цих структур.

Вибіркове зв'язування ландоміцинів з ензимом NQO1 може також пояснити вибіркочку генерацію виключно пероксиду водню під дією цих антибіотиків на злоскісні клітини. Як відомо з даних літератури, NQO1 приводить до 2-електронного відновлення хінонів у гідро-

Порівняння впливу дикумаролу (DC), кверцетину (Q) та менадіону (M) в різних концентраціях на продукцію пероксиду водню під дією ландоміцину А (LA) у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat. Базальний рівень H_2O_2 у клітинах прийнято за 1,00

Час, год	Контроль	+Q 5 μM	+Q 10 μM	+ M 5 μM	+ M 10 μM	+ DC 2 μM	+ DC 5 μM	+ DC 10 μM	+ DC 25 μM
1	1,03±0,05	1,10±0,14	0,98±0,07	1,02±0,03	1,09±0,03	1,15±0,09	1,37±0,1	1,73±0,09	2,03±0,1
3	1,08±0,05	1,43±0,5	1,00±0,1	1,02±0,08	1,05±0,03	0,69±0,12	0,77±0,14	0,75±0,17	0,94±0,14
6	1,12±0,08	0,88±0,09	0,70±0,05	0,96±0,02	1,04±0,03	0,58±0,09	0,72±0,11	0,71±0,12	0,77±0,12
	LA 1 μM	+Q 5 μM	+Q 10 μM	+ M 5 μM	+ M 10 μM	+ DC 2 μM	+ DC 5 μM	+ DC 10 μM	+ DC 25 μM
1	5,18±0,13	3,95±0,19 ¹	4,75±0,48	2,40±0,12 ²	2,19±0,06 ²	4,33±0,11	3,96±0,2 ¹	3,75±0,11 ¹	4,41±0,22
3	3,40±0,08	2,42±0,05 ³	3,34±0,17	1,81±0,07 ⁴	1,69±0,08 ⁴	2,42±0,18 ³	1,86±0,28 ⁴	1,67±0,25 ⁴	2,38±0,24 ³
6	1,65±0,04	1,24±0,09	1,20±0,03	1,57±0,04	1,41±0,07	1,49±0,23	1,49±0,23	1,46±0,26	1,66±0,43

¹ $p < 0,05$ відносно LA 1 μM (1 год); ² $p < 0,0001$ відносно LA 1 μM (1 год); ³ $p < 0,05$ відносно LA 1 μM (3 год); ⁴ $p < 0,0001$ відносно LA 1 μM (3 год)

хінони [24]. При цьому оминається етап утворення нестабільного семіхінону, що спостерігається під дією NQO2 та супроводжується активною продукцією супероксид-аніонів [25].

Оскільки ландоміцини дуже швидко дифундують через плазматичну мембрану клітин-мішеней, очевидно, що їх відновлені форми (LEH_2 , $LANH_2$) будуть вивільнятися у позаклітинне середовище по градієнту концентрації. В позаклітинному середовищі ці відновлені форми ландоміцинів можуть бути окиснені самим LE/LA з утворенням семіхінону LE/LA, що в результаті приводить до продукції H_2O_2 . Така хімічна реакція відома як реакція компропорціонування і описана в літературі для інших хінонвмісних сполук, зокрема для менадіону [24]. Узагальнену схему позаклітинної генерації H_2O_2 під дією ландоміцинів наведено на рис. 3. Незважаючи на те, що ландоміцини відновлюються ферментом NQO1 всередині клітини, генерація H_2O_2 відбувається виключно в позаклітинному середовищі, що й пояснює значний інгібіторний ефект позаклітинної каталази на продукцію АФК під дією ландоміцинів [26]. Пероксид водню — відносно стабільна молекула, що може вільно переноситися через аквапорини клітинної мембрани [27], на відміну від $O_2^{\cdot-}$ -аніонів, які, маючи негативний за-

ряд, можуть покинути мітохондрії лише шляхом активного транспорту через вольтажзалежні аніонні канали [28]. Саме тому H_2O_2 , що генерується внаслідок самоокиснення-самовідновлення ландоміцинів у позаклітинному середовищі, може знову проникати у клітину та індукувати активацію ефекторної каспази-7 шляхом її прямого окиснення без участі мітохондрій [26].

Тіолтаргетна активність ландоміцинів та її роль у реалізації здатності цих сполук долати набуту стійкість пухлин до ліків. Незважаючи на структурну спорідненість менадіону та ландоміцинів, що визначає їх специфічне зв'язування з НАД(Ф)-дегідрогеназою NQO1, молекулярні механізми дії цих сполук суттєво різняться. Зокрема, додавання каталази практично повністю пригнічує продукцію пероксиду водню під дією менадіону *in vitro* [24], тоді як у випадку з ландоміцинами вона знижувала цей показник лише на 50–60 % [26]. Усе це вказує на наявність інших механізмів протипухлинної дії ландоміцинів, крім їх впливу на NQO1 та генерацію пероксиду водню.

Як було показано нами раніше, скевенджери АФК істотно знижують продукцію H_2O_2 під дією ландоміцинів, однак незначно впливають на їх цитотоксичну активність щодо зло-

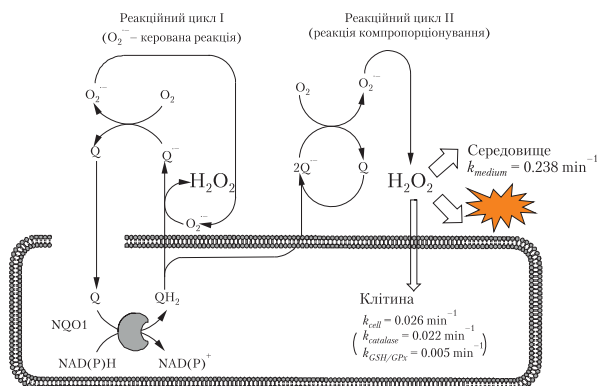


Рис. 3. Схема генерції пероксиду водню під дією менадіону та ландоміцинів на злрякісні клітини (цит. з [24])

якісних клітин. Єдиним антиоксидантом, який проявляв атипову дію на ландоміцини, був N-ацетилцистеїн (NAC), який практично повністю пригнічував цитотоксичну активність цих антибіотиків як на 24 год, так і на 72 год інкубації, однак його АФК-інгібіторна активність була слабшою, ніж у каталази [17, 26]. Застосування методу люмінесцентної детекції пероксиду водню ROS-Glo показало, що NAC практично не впливає на індукцію АФК ландоміцином E у позаклітинному середовищі, однак знижує її на 25 % за наявності клітин (рис. 4). Безперервна дія NAC протягом 24 год практично повністю блокувала проапоптотичну активність LE, проте короткотривала обробка клітин цим антиоксидантом (1 год) з подальшою заміною культурального середовища перед додаванням LE проявляла значно слабший захисний ефект (рис. 4). Це свідчить, що цитопротекторна дія NAC може бути зумовлена іншими механізмами, крім прямого інгібування продукції АФК під дією препарату, зокрема безпосереднім блокуванням проникнення препарату в клітини-мішені.

Ландоміцини мають слабку флуоресценцію на довжині хвилі 533 нм (канал FL1 проточного цитометра), однак при проникненні в клітини характер їх флуоресценції різко змінюється – він зміщується в діапазон 585 нм (канал FL2 проточного цитометра) і стає в 2–3 рази

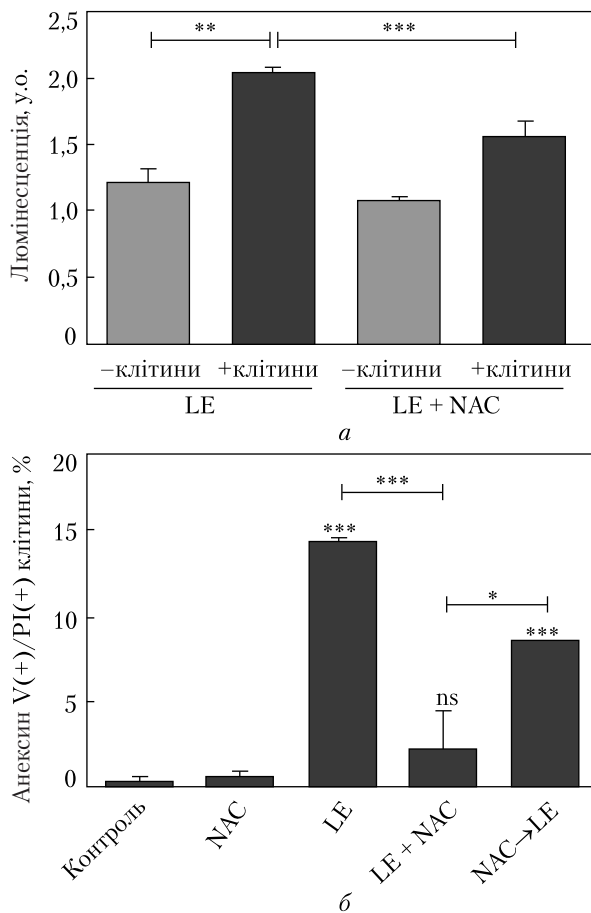


Рис. 4. Дослідження механізму цитопротекторної дії NAC у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat під дією LE: *а* – визначення рівня H₂O₂ під дією LE (6 мкМ) та NAC (1 мМ) у культуральному середовищі за присутності чи відсутності 1 × 10⁴ клітин Jurkat (тест ROS-Glo H₂O₂); *б* – порівняння безперервної дії 1 мМ NAC протягом 24 год разом з LE (LE+NAC) та короткотривалої (1 год) обробки клітин Jurkat N-ацетилцистеїном з подальшим відмиванням NAC перед додаванням LE (NAC→LE) на LE-індуковану апоптотичну загибель (фарбування FITC-міченим анексіном V та пропідій йодидом, проточна цитофлуориметрія) (цит. з [26])

інтенсивнішим. Для перевірки гіпотези щодо здатності NAC блокувати поглинання LE клітинами було проведено вимірювання інтенсивності внутрішньоклітинної флуоресценції досліджуваної сполуки за допомогою проточної цитометрії (рис. 5). Показано, що присутність у культуральному середовищі NAC зна-

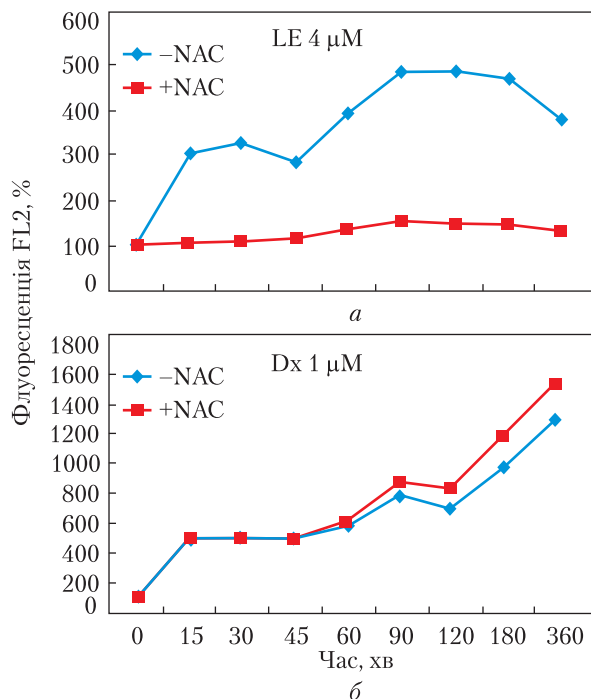


Рис. 5. Порівняння модуляторного впливу N-ацетилцистеїну на проникнення LE- і Dx-комплексів у клітини T-лейкемії людини лінії Jurkat. Кількісний аналіз флуоресценції препаратів у клітинах-мішенях у часовій залежності виконано за допомогою проточної цитометрії (канал FL2, $\lambda = 585$ нм)

чно, проте не повністю, знижувала внутрішньоклітинну флуоресценцію LE, тоді як флуоресценція доксорубіцину не змінювалася при внесенні NAC. Це свідчить, що NAC не лише знижує продукцію АФК під дією LE, а й інгібує поглинання досліджуваного антибіотика пухлинними клітинами.

Можливим поясненням такого блокування проникнення ландоміцинів у клітини під дією NAC є утворення аддуктів препарату з цим антиоксидантом. Для дослідження цього явища було проведено мас-спектрометричний аналіз суміші LE і NAC і показано, що при цьому утворюється ковалентний аддукт LE:NAC у масовому співвідношенні 1:1. Згідно з даними мас-спектрометрії, NAC приєднується до молекули ландоміцинів між 2-м і 3-м циклами в агліконі, тому утворення аддуктів з тіолами є характерною ознакою всіх ландоміцинів,

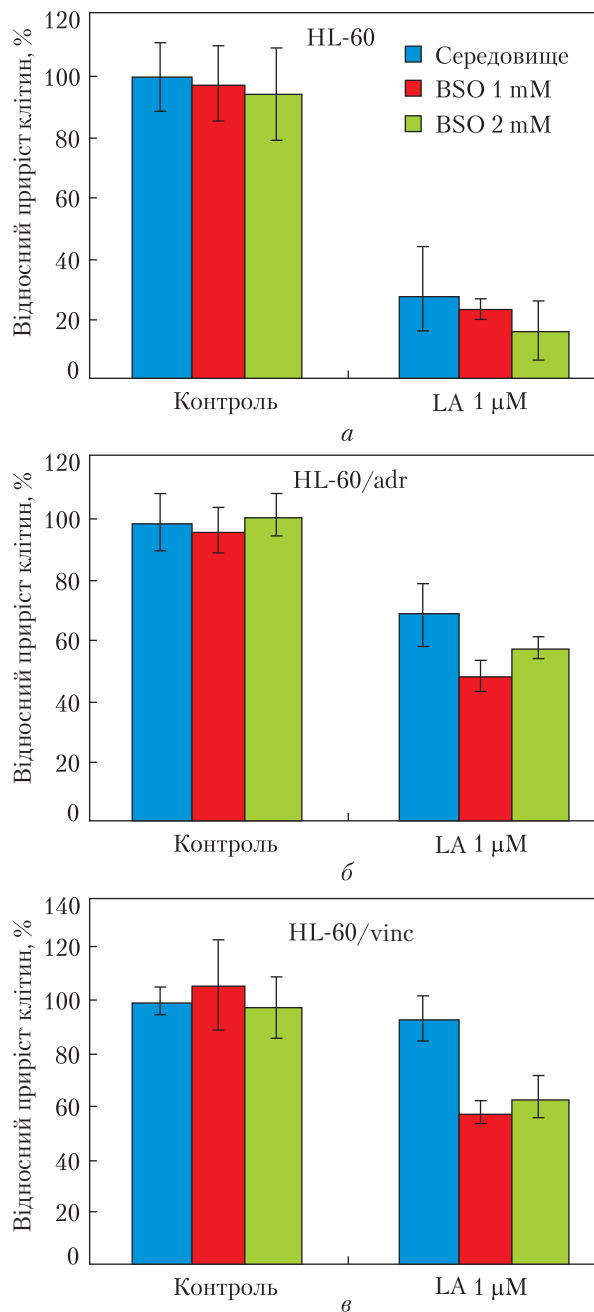


Рис. 6. Модуляторний вплив L-бутіонін-S-сульфоксиміну на цитотоксичну активність LA щодо клітин лейкозу людини лінії HL-60 та її резистентних субліній HL-60/adr (надекспресія білка MRP-1) і HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну); фарбування трипановим синім, 24 год інкубації

незалежно від довжини їх олігосахаридного ланцюга [22, 23]. Такі аддукти мають більшу гідрофільність, ніж молекули ландоміцинів, що й перешкоджає їх проникненню шляхом дифузії у клітини-мішені. Цим пояснюється і спостережений нами парадоксальний інгібіторний ефект N-ацетилцистеїну щодо ландоміцинів. Цікаво, що менадїон також здатний утворювати аддукти з N-ацетилцистеїном [29]. Тому така особливість ландоміцинів не є унікальною, а характерна для багатьох природних сполук, що містять у своїй структурі *para*-хіноновий залишок.

Отже, зниження продукції АФК ландоміцинами під дією НАС пояснюється тим, що аддукти ландоміцинів з НАС фізично не можуть проникнути у клітини і, відповідно, не зв'язуються з NQO1 і не генерують АФК. Однак, як показали фізико-хімічні дослідження, ці аддукти не є стабільними, швидко розпадаються, а вивільнена молекула ландоміцину знову приєднує до себе наступну молекулу НАС [22]. Цим і пояснюється втрата АФК-протекторної активності НАС на 12 і 24 год дії ландоміцинів, що було показано нами раніше [26].

Оскільки ландоміцини утворюють ковалентні аддукти з N-ацетилцистеїном *in vitro*, можна припустити, що ці сполуки будуть активно зв'язуватися з усіма цитозольними тілами при проникненні цих антибіотиків у клітини-мішені. З огляду на те, що глутатіон є найпоширенішим небілковим тіолом у клітинах ссавців [30], ми детально дослідили вплив ландоміцинів на функціонування клітинної системи глутатіону.

Відомо, що підвищений рівень глутатіону характерний для багатьох пухлин, які є резистентними до дії ліків [31]. Ландоміцини зберігають свій високий протипухлинний потенціал навіть щодо тих злоякісних клітин, які мають множинні механізми стійкості до ліків (зни-

ження чутливості у 2–3 рази), на відміну від класичних протипухлинних засобів, для яких цей показник знижується у 100–200 разів [15]. Таке незначне зниження цитотоксичної активності ландоміцинів щодо пухлин, стійких до ліків, можна пояснити природним зростанням у них рівня глутатіону. Якщо ця гіпотеза є коректною, то вплив інших чинників, які знижують рівень вільного глутатіону, має посилити дію ландоміцину на клітини, резистентні до хіміотерапії. Ми використали BSO (L-бутіонін-S-сульфоксимін) – незворотний інгібітор ензиму γ -глутамілцистеїнсинтетази, задіяний у кінцевій фазі синтезу L-глутатіону [32].

Було досліджено спільну дію LA і BSO на клітини лейкозу людини лінії HL-60 та її резистентних субліній HL-60/adr(MRP-1+) і HL-60/vinc (P-gp+) (рис. 6). Показано, що BSO вдвічі підвищував чутливість клітин HL-60/vinc до LA, а клітин HL-60/adr – в 1,5 раза. Отже, зниження внутрішньоклітинного рівня глутатіону посилює дію ландоміцинів на злоякісні клітини, що підтверджує нашу гіпотезу щодо ключової ролі тіолтаргетної функції ландоміцинів у доланні набутої резистентності пухлин до ліків.

Висновки. Унікальною особливістю ангуциклінових антибіотиків родини ландоміцинів є їхня здатність долати набуту стійкість пухлин до хіміотерапії. Показано, що цей феномен ґрунтується на двох основних факторах: ранній індукції продукції пероксиду водню у злоякісних клітинах без участі мітохондрій та специфічному зв'язуванні цих антибіотиків з клітинними тілами, що було показано за допомогою мас-спектрометрії. Оскільки стійкість до хіміотерапії, як правило, асоційована зі зростанням клітинного рівня глутатіону, підвищена афінність ландоміцинів до тіолів може пояснити вибірковість їх дії до злоякісних клітин, резистентних до ліків.

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Crawford S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front. Pharmacol.* 2013. **4**: 68. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00068>
2. Pirker R., Pereira J.R., Szczesna A. et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 2009. **373**(9674): 1525–1531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60569-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60569-9)
3. Chaiswing L., St Clair W.H., St Clair D.K. Redox Paradox: A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* 2018. **29**(13): 1237–1272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7485>
4. Farge T., Saland E., de Toni F. et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 2017. **7**(7): 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
5. Hirpara J.L., Subramaniam K., Bellot G. et al. Superoxide induced inhibition of death receptor signaling is mediated via induced expression of apoptosis inhibitory protein cFLIP. *Redox Biol.* 2020. **30**: 101403. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101403>
6. Ghigo A., Li M., Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. **1863**(7B): 1916–1925. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.021>
7. Murabito A., Hirsch E., Ghigo A. Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Is Mitochondrial Dysfunction the Answer? *Front. Cardiovasc. Med.* 2020. **7**: 35. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00035>
8. Martins-Teixeira M.B., Carvalho I. Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *Chem. Med. Chem.* 2020. **15**(11): 933–948. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000131>
9. Wang K., Jiang J., Lei Y., Zhou S., Wei Y., Huang C. Targeting Metabolic–Redox Circuits for Cancer Therapy. *Trends Biochem. Sci.* 2019. **44**(5): 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.001>
10. Benhar M. Oxidants, Antioxidants and Thiol Redox Switches in the Control of Regulated Cell Death Pathways. *Antioxidants (Basel).* 2020. **9**(4): 309. <https://doi.org/10.3390/antiox9040309>
11. Gamcsik M.P., Kasibhatla M.S., Teeter S.D., Colvin O.M. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers.* 2012. **17**(8): 671–691. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.715672>
12. Chiou T.J., Tzeng W.F. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology.* 2000. **154**(1-3): 75–84. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00321-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00321-8)
13. Loor G., Kondapalli J., Schriever J.M., Chandel N.S., Vanden Hoek T.L., Schumacker P.T. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2010. **49**(12): 1925–1936. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021>
14. Tedef M., Margolin K., Ahn C. et al. Mitomycin C and menadione for the treatment of advanced gastrointestinal cancers: a phase II trial. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1995. **121**(2): 103–106. <https://doi.org/10.1007/BF01202221>
15. Korynevska A., Heffeter P., Matselyukh B., Elbling L., Micksche M., Stoika R., Berger W. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E. *Biochem. Pharmacol.* 2007. **74**(12): 1713–1726. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.026>
16. Panchuk R. Signaling pathways involved in apoptosis induced by novel angucycline antibiotic landomycin E in Jurkat T-leukemia cells. *Biopolym. Cell.* 2011. **27**(2): 124–131. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00008B>
17. Panchuk R.R., Lehka L.V., Matselyukh B.P., Kril' I.Y., Stoika R.S. Search for and identification of molecular targets of angucycline antibiotic landomycin E in human tumor cells. *Studia Biologica.* 2012. **6**(1): 5–19. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.0601.194>
18. Jiang F., Zhang Y., Dusting G.J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol. Rev.* 2011. **63**(1): 218–242. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002980>
19. Ross D., Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol.* 2004. **382**: 115–144. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)82008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)82008-1)
20. Iskander K., Jaiswal A.K. Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 2005. **153-154**: 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.03.019>
21. Pink J.J., Planchon S.M., Tagliarino C., Varnes M.E., Siegel D., Boothman D.A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**(8): 5416–5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5416>
22. Terenzi A., La Franca M., van Schoonhoven S. et al. Landomycins as glutathione-depleting agents and natural fluorescent probes for cellular Michael adduct-dependent quinone metabolism. *Commun. Chem.* 2021. **4**(1): 162. <https://doi.org/10.1038/s42004-021-00600-4>

23. Lehka L., Panchuk R., Berger W., Rohr J., Stoika R. The role of reactive oxygen species in tumor cells apoptosis induced by landomycin A. *Ukr. Biochem. J.* 2014. **87**(5): 72–82. <https://doi.org/10.15407/ubj87.05.072>
24. Watanabe N., Forman H.J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. **411**(1): 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00716-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00716-6)
25. Gong X., Gutala R., Jaiswal A.K. Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism. *Vitam. Horm.* 2008. **78**: 85–101. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00005-2)
26. Panchuk R.R., Lehka L.V., Terenzi A. et al. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radic. Biol. Med.* 2017. **106**: 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.024>
27. Bienert G.P., Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. **1840**(5): 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
28. Lustgarten M.S., Bhattacharya A., Muller F.L., Jang Y.C., Shimizu T., Shirasawa T., Richardson A., Van Remme H. Complex I generated, mitochondrial matrix-directed superoxide is released from the mitochondria through voltage dependent anion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. **422**(3): 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.055>
29. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009. **30**(1-2): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
30. Dickinson D.A., Forman H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 2002. **64**(5-6): 1019–1026. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)
31. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* 2002. **2**(1): 48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
32. Griffith O.W. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* 1982. **257**(22): 13704–13712.

Rostyslav R. Panchuk

Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2908-8213>

DOUBLE-ACTING ANTICANCER DRUGS TO OVERCOME THE ACQUIRED RESISTANCE OF MALIGNANT CELLS TO CHEMOTHERAPY

According to the report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine, December 22, 2021

Molecular mechanisms underlying the unique ability of angucycline antibiotics of the landomycin family to overcome the acquired multi-drug resistance of tumor cells are studied. This phenomenon is shown to be based on the early induction of hydrogen peroxide in malignant cells without the involvement of mitochondria and the specific binding of these antibiotics to cellular thiols. It is demonstrated that early H₂O₂ generation by landomycins is mediated by NQO1 enzyme, and the use of its specific inhibitor (dicoumarol) significantly decreased both ROS production and cytotoxic activity of landomycins. Another mode of action of these anticancer antibiotics is tightly connected with their innate ability to bind to cellular thiols, thus leading to depletion of glutathione pool and subsequent induction of apoptosis. Cancer drug resistance is usually associated with increased cellular levels of glutathione, thus the increased affinity of landomycins for thiols may explain the selectivity of their action on drug-resistant tumor cells.

Keywords: cancer drug resistance, reactive oxygen species, thiols, landomycins, apoptosis.