

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83



Изучение действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы

Т.И. Кушнир¹, Н.Е. Арноцкая¹, И.А. Кудрявцев¹, А.А. Митрофанов¹, А.Х. Бекашев¹, В.Г. Згода², В.Е. Шевченко¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»; Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. В значительной степени резистентность мультиформной глиобластомы к генотоксической терапии связана с нарушением регуляции реакций на повреждение и репарацию ДНК. Таким образом, подавление механизмов репарации ДНК – приоритетный путь для увеличения выживаемости больных с данной патологией. Куркумин повышает эффективность стандартных химиотерапевтических препаратов, однако его воздействие на системы репарации ДНК недостаточно изучено.

Цель исследования – изучение молекулярных механизмов действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы.

Материалы и методы. Протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, клеточные технологии.

Результаты. В протеомах 2 типов клеток мультиформной глиобластомы (контроля и опыта) в целом идентифицированы 2757 белков, из которых 39 % были дифференциально экспрессированными. Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих большую роль в канцерогенезе.

Заключение. Куркумин супрессирует эксцизионную репарацию ДНК, снижая экспрессию детерминант APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, куркумин, протеом, эксцизионная репарация ДНК, масс-спектрометрия

Для цитирования: Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А. и др. Изучение действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):75–83. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83.

Study of the effect of curcumin on excision DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells

T.I. Kushnir¹, N.E. Arnotskaya¹, I.A. Kudryavtsev¹, A. A. Mitrofanov¹, A.K. Bekyashev¹, V.G. Zgoda², V.E. Shevchenko¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; Bld. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 10 Bld. 8, Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russia

Contacts: Valeriy Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Introduction. To a large extent, the resistance of glioblastoma multiforme to genotoxic therapy is associated with a dysregulation of responses to DNA damage and repair. Thus, suppression of DNA repair mechanisms is a priority pathway for increasing the survival rate of glioblastoma multiforme patients. Curcumin enhances the effectiveness of standard chemotherapy drugs, but its effect on DNA repair systems is not understood.

The study objective – to study the molecular mechanisms of curcumin action on excisional DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells.

Materials and methods. high-resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

Results. In the proteomes of two types of glioblastoma multiforme cells (control and experiment), a total of 2757 proteins were identified, of which 39 % were differentially expressed. Significant changes have been found in many signaling cascades that play an important role in carcinogenesis.

Conclusion. Curcumin suppressed excisional DNA repair by decreasing the expression of determinants APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA.

Key words: curcumin, glioblastoma multiforme, curcumin, proteome, excision DNA repair, mass spectrometry

For citation: Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A. et al. Study of the effect of curcumin on excision DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(4):75–83. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83.

ВВЕДЕНИЕ

Мультиформная глиобластома (МГБ) является наиболее распространенной первичной высокоинвазивной глиальной опухолью головного мозга человека [1]. При выполнении стандартного протокола комплексного лечения данного заболевания медиана выживаемости больных составляет 12–15 мес. Отчасти это объясняется тем, что МГБ имеет высокую степень внутриопухолевой гетерогенности как на клеточном, так и на генетическом уровне, что является препятствием для преодоления резистентности к лечению. К сожалению, таргетная терапия в этом случае неэффективна [2]. Методами лечения, улучшающими выживаемость при МГБ, по-прежнему остаются радикальное удаление опухоли, лучевая терапия (ЛТ) и химиотерапия (ХТ) с использованием темозоломида или его комбинации с другими препаратами [3].

Одно из перспективных направлений повышения эффективности нехирургических методов лечения онкологических больных — разработка методов повышения чувствительности опухолевых клеток к ЛТ и ХТ, которые базируются на использовании дефектов в системе репарации для достижения наиболее результативного противоопухолевого эффекта.

Устранение повреждений нативной ДНК требует согласованных действий ряда генов репарации для поддержания целостности генома, включая восстановление двунитевых разрывов ДНК, эксцизионную репарацию (ЭР) и прямую репарацию повреждений. Эксцизионная репарация — сложный, многоэтапный процесс. Известны три типа ЭР: неспаренных оснований (mismatch repair, MMR), оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). Все типы ЭР имеют общие этапы действия, но принципиально различаются между собой [4].

Под воздействием ЛТ и ХТ в клетках МГБ происходит повреждение генома, активирующее различные механизмы репарации ДНК [5]. Полиморфизм молекулярно-генетических нарушений в клетках МГБ в ответ на генотоксическую терапию порождает разновекторный отклик на повреждение ДНК (ОПД), что является одним из механизмов формирования резистентности к лечению. Лучшее понимание механизмов, регулирующих ОПД при МГБ, поможет прояснить роль основных детерминант ОПД в ответе на ХТ и ЛТ и способствовать разработке персонализированного метода лечения данной патологии на основе ингибиторов ОПД [6].

В последние десятилетия активно изучают природные соединения и их производные для усиления эффективности ЛТ и ХТ злокачественных новообразований [7]. Куркумин (ККМ) и другие куркумины представляют собой природные полифенольные соединения (рис. 1), выделенные из куркумы (*Curcuma longa*). Доклинические и клинические исследования продемонстрировали химиотерапевтический потенциал ККМ при различных видах рака [8, 9]. Куркумин воздействует на канцерогенные сигнальные пути, связанные с клеточной пролиферацией, апоптозом, аутофагией, ангиогенезом, иммунным ответом, инвазией и метастазированием через факторы транскрипции, рецепторы, киназы, цитокины, ферменты и факторы роста [10]. Куркумин модулирует различные сигнальные каскады, которые обычно дисрегулируемы при МГБ, включая Hedgehog [11], STAT3 [12], PI3K/АКТ/mTOR [13], P53 [14] и другие, однако его действие на процессы репарации ДНК изучены недостаточно. Тем не менее, способность ККМ повышать эффективность стандартных ХТ-препаратов оправдывает его использование в качестве потенциального адъюванта на основе нутрицевтиков для лечения МГБ. Хотя такие проблемы, как биодоступность, плохая абсорбция и быстрое системное выведение, могут снизить его эффективность, мульти-модальная модуляция сигнальных путей при нанодоставке ККМ имеет большие перспективы в терапии МГБ.

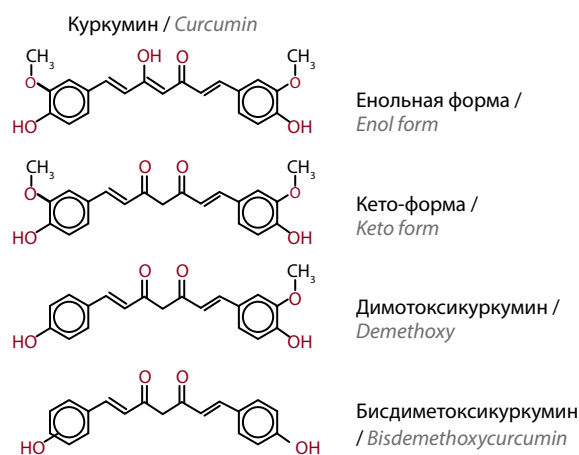


Рис. 1. Структура енольной формы и кето-формы куркумина, диметоксикуркумина и бисдиметоксикуркумина
Fig. 1. The structure of the enol form and the keto form of curcumin, dimethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin

В этом исследовании основное внимание уделялось изучению молекулярных механизмов действия ККМ на ЭР, от которых во многом зависит эффект темозоломида, в том числе резистентность к этому препарату. Мы использовали методы протеомной масс-спектрометрии для изучения действия ККМ на линию клеток U251 МГБ человека. Куркумин оказывал существенное влияние на протеом клеток U251 МГБ. Так, из 2757 идентифицированных протеинов 39 % составляли дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ). Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих важную роль в канцерогенезе. В частности, под действием ККМ в клетках U251 наблюдалась супрессия репарации ДНК, на что указывало уменьшение экспрессии более чем в 2 раза детерминант сигналингов, ответственных за ЭР ДНК (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA2). Полученные данные могут использоваться в дальнейшем при разработке терапевтических схем с участием ККМ для лечения МГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Клетки линии U251 МГБ человека культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в среде DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, Россия) [15]. При достижении 70 % монослоя опухолевые клетки двукратно отмывали бесывороточной средой и культивировали в ней в течение 24 ч при 37 °C без и в присутствии 10 мкМ ККМ (Sigma Aldrich, США). Куркумин растворяли в DMSO и добавляли к клеткам, а 0,1 %-ный раствор DMSO использовали в качестве контроля. Опытные и контрольные клетки выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали. После инкубации опухолевые клетки 3 раза отмывали фосфатно-буферным раствором на центрифуге BIOSAN LMC-3000 (Biosan Ltd, Латвия) со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин и замораживали при –80 °C.

Приготовление образцов для масс-спектрометрии. Размороженные клетки U251 лизировали на шейкере Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) 15 мин при 4 °C с помощью Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя, центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия) в течение 10 мин при 12000 об/мин и 4 °C. Надосадочную жидкость подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений [16]. После трипсинолиза белков образцы упаривали при 30 °C в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco Corporation, США). Продукты трипсинолиза лизатов опухолевых клеток (100 мкг) растворяли в 50 мкл фазы А (20 мМ NH₄OH, pH 10) и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18 (2,1 × 500 мм; 3,5 мкм, Agilent) на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и ультрафио-

летовым детектором [15]. Фракции упаривали досуха при 30 °C в центрифужном испарителе Labconco CentriVar (Labconco Corporation, США) и повторно растворяли в 100 мкл 0,1 %-ной муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили для каждой пробы в 3 технических повторах с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF-X (Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, США) [17]. Масс-спектрометрические данные загружали в программное обеспечение MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия). Для идентификации белков использовали встроенный в программное обеспечение MaxQuant поисковый алгоритм Andromeda и базу данных UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>) [17]. Количественный анализ осуществляли на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма [18]. Статистический анализ выполняли в программном обеспечении Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили с помощью программ DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), а также открытых баз данных Swiss-Prot (www.uniprot.org/uniprot), Gene Ontology (GO, geneontology.org), PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) и KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.genome.jp/kegg), белок-белковые взаимодействия анализировали с помощью базы данных STRING v11.0 (<https://string-db.org>) с комбинированным скором >0,4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масс-спектрометрический анализ. Мы использовали label-free (без метки) количественный протеомный нано-ВЭЖХ–МС/МС метод для детектирования и сравнения белкового профиля в лизатах линии клеток U251 МГБ без обработки их куркумином (10 мкМ) и после нее. Анализ триптических пептидов, проведенный с помощью программы MaxQuant, идентифицировал в общей сложности 2757 белков при сопоставлении 155329 МС/МС спектров с пептидными последовательностями в базе данных UniProtKB_2021 с ложным уровнем обнаружения (FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. В результате обработки данных в исследуемых образцах с использованием программы Perseus были идентифицированы:

- в 1-м образце (U251) — 2553 белка по 13 497 пептидам;
- во 2-м образце (U251+ККМ) — 2421 белок по 13 313 пептидам.

По 2 или более пептидным совпадениям идентифицированы 2194 протеина, по 1 пептидному совпа-

дению — 563 протеина. Из них 1080 белков были дифференциально экспрессированными, присутствовали во всех образцах клеток и имели статистически значимые изменения экспрессии в клеточной линии U251 ($p < 0,05$) по сравнению с U251 + ККМ с кратностью изменения >2 или $<0,5$. Экспрессия 662 белков повышалась, а экспрессия 418 белков снижалась в клетках U251 по сравнению с клетками U251, обработанных куркумином.

Распределение и онтологический анализ дифференциально экспрессированных белков. Анализ GO показал, что ДЭБ присутствовали во многих категориях субклеточных локализаций, включая цитоплазму (16 %), клеточную мембрану (12 %), митохондрии (12 %), ядро (7 %) и цитоскелет (7 %). Дифференциально экспрессированные белки оказались вовлеченными в различные биологические процессы и проявляли следующие функции: связывающую (46,0 %), каталитическую (33,2 %), молекулярно-регуляторную (8,0 %), транспортную активность (4,7 %), структурно-молекулярную активность (4,4 %).

Основная часть ДЭБ представлена метаболическими ферментами (16 %), протеинмодифицирующими энзимами (14,6 %), протеинами метаболизма нуклеиновых кислот (11,8 %), цитоскелетными белками (9,3 %), трансляционными протеинами (8,1 %), транспортерами (7,4 %), модуляторами протеинсвязывающей активности (5,8 %), протеинами мембранного трафика (5,4 %).

Дифференциально экспрессированные белки принимали участие более чем в 100 сигнальных каскадах. Далее представлены наиболее значимые сигнальные пути. Согласно данным, представленным в табл. 1, ДЭБ в основном включены в сигнальные каскады, связанные с процессом развития МГБ.

С помощью сервиса DAVID получена группа генов, продукты которых участвуют в сигнальных каскадах, связанных с репарацией ДНК (табл. 2). Согласно представленным данным 8 генов кодируют белки, участвующие в ЭР ДНК [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

В значительной степени резистентность опухолевых клеток к ЛТ и ХТ связана с нарушением регуляции реакции на повреждение и репарацию ДНК. Эти компенсаторные механизмы могут приводить к повышению устойчивости данных клеток к ДНК-повреждающим агентам, влияя на клеточный ответ и результаты генотоксической терапии [20]. Таким образом, подавление механизмов репарации ДНК — приоритетный путь для увеличения выживаемости больных МГБ. Арсенал ингибиторов репарации ДНК пока невелик [21], что связано с их чрезмерной токсичностью в эффективных дозах и/или резистентностью к терапии через компенсаторные пути, которые ограничивают их эффективность. В этом отношении ККМ имеет ряд преимуществ: низкую токсичность и многофакторное

действие. Кроме того, он может эффективно подавлять множественную лекарственную устойчивость опухоли и улучшать терапевтический эффект ХТ-препаратов [22].

Противоопухолевый эффект ККМ отмечен для различных типов злокачественных новообразований, включая МГБ [23]. Куркумин действует одновременно на несколько молекулярных мишеней, поэтому его воздействие на опухоль связано с разными сигнальными каскадами [24]. Полученные нами данные подтверждают этот тезис. Куркумин модулировал в клетках U251 важнейшие сигнальные каскады, связанные с патогенезом МГБ, включая сигнальный каскад интегринов, рецептора EGF (epidermal growth — эпидермальный фактор роста), PDGF (platelet-derived growth factor — фактор роста тромбоцитов), VEGF (vascular endothelial growth factor — фактор роста эндотелия сосудов), Wnt, TGF- β (transforming growth factor β — трансформирующий фактор роста β) и др. (см. табл. 1). На данный момент ККМ является перспективным адъювантом для текущих ЛТ и ХТ МГБ [25].

В нашем исследовании ККМ в концентрации 10 мкМ существенно влиял на протеом клеток U251 МГБ, на что указывало довольно большое количество ДЭБ (39 %), которые являлись детерминантами различных сигнальных каскадов. Наиболее значимые из них представлены в табл. 1.

В соответствии с анализом GO, 1080 ДЭБ входили в состав почти всех категорий субклеточной локализации, участвовали во многих биологических процессах, обладали широким спектром молекулярных функций и включали различные виды белков.

Протеомный анализ идентифицировал 8 ДЭБ, участвующих в процессах ЭР, включая детерминанты (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA2) сигнальных каскадов MMR, BER и NER. Согласно данным, представленным в табл. 2, все 8 ДЭБ заметно снижают экспрессию при действии ККМ, указывая на уменьшение репарационной активности клеток U251 МГБ. Для получения более полной картины выполняли подробный биоинформатический анализ по 8 идентифицированным белкам. В дополнение к анализу GO и KEGG мы использовали базу данных STRING v11 при построении сети белок-белковых взаимодействий для выявления ассоциации между этими белками. Сетевая визуализация идентифицированного списка белков, участвующих в процессах репарации ДНК, показана на рис. 2. Результаты, основанные на функциональной ассоциации между 8 белками, показали, что все они тесно связаны друг с другом через скоординированную интерактивную сеть белок-белковых взаимодействий.

Ответ на ТМЗ варьируется у разных пациентов с МГБ. В случае МГБ, резистентных к ТМЗ, трудно предотвратить прогрессирование или рецидив опухоли [26]. Ранее проведенные исследования показали, что резистентность к ТМЗ возникает в результате

Таблица 1. Сигнальные каскады клеток U251 мультиформной глиобластомы, на которые воздействовал куркумин**Table 1.** Signaling cascades of U251 glioblastoma multiforme cells affected by curcumin

Индекс KEGG KEGG Index	Сигнальный каскад Pathway	Количество дифференциально экспрессированных белков Number of differentially expressed proteins
P00034	Сигнальный каскад интегринов Integrin signalling pathway	23
P00031	Воспаление, опосредованное хемокинами и цитокинами Inflammation mediated by chemokine and cytokine	15
P00018	Сигнальный каскад рецептора EGF EGF receptor signaling pathway	14
P00047	Сигнальный каскад PDGF PDGF signaling pathway	13
P00005	Ангиогенез Angiogenesis	12
P00021	Сигнальный каскад FGF FGF signaling pathway	11
P00006	Сигнальный каскад апоптоза Apoptosis signaling pathway	9
P00056	Сигнальный каскад VEGF VEGF signaling pathway	8
P00057	Сигнальный каскад Wnt Wnt signaling pathway	8
P00036	Интерлейкиновый сигнальный каскад Interleukin signaling pathway	8
ko03420	Экзационная репарация ДНК DNA excisional repair	8
P04393	Сигнальный каскад Ras Ras Pathway	7
P00052	Сигнальный каскад TGF- β TGF- β signaling pathway	7

Примечание. KEGG — Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; EGF — эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor); PDGF — фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor); FGF — факторы роста фибробластов (fibroblast growth factor); VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor); TGF- β — трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β).

Note. KEGG — Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; EGF — epidermal growth factor; PDGF — фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor); FGF — fibroblast growth factor; VEGF — vascular endothelial growth factor; TGF- β — transforming growth factor β .

действия систем репарации ДНК (MGMT, MMR и BER), других механизмов, таких как аутофагия и присутствие опухолевых стволовых клеток [27, 28]. Учитывая снижение множественной лекарственной устойчивости под действием ККМ, становится актуальным изучение на модельной клеточной системе U251 МГБ его эффекта на ЭР ДНК.

Экзационная репарация неспаренных оснований (MMR). Ошибочно вставленные основания — мисмэтчи (mismatches) — уникальный тип повреждений ДНК, состоящих из неизмененных оснований. Такие повреждения являются исключительно дефектами структуры. Также мишенью MMR выступают петли делеции/вставки. Основным белком-инициатором MMR является MSH2, обнаруживающий ошибку в структуре нити ДНК и в зависимости от типа повреждения образующий гетеродимер либо с MSH6, либо с MSH3 (комплексы-MutSa или MutS β). Куркумин не оказывал

действия на экспрессию MSH2. Для коррекции мисмэтча требуется MSH6, а для исправления петель делеции/вставки необходимо участие и MSH6, и MSH3 [29]. Полагают, что мутации MSH6 играют большую роль в возникновении рецидива глиомы, приобретенной устойчивости к алкилирующим агентам и нестабильности генома [30]. После действия ККМ экспрессия MSH6 понижалась в 7,3 раза.

Другим идентифицированным детерминантом MMR процесса является PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток, proliferating cell nuclear antigen), который необходим для активации эндонуклеазной активности комплекса MutLa, состоящего из белков MLH1 и PMS2. Комплекс MutLa объединяет и координирует взаимодействие между белками, распознающими несоответствия, и другими белками MMR. На ДНК он загружается с помощью специального загрузчика RFC2 (replication factor C2), что приводит

Таблица 2. Дифференциально экспрессированные белки, участвующие в сигнальных каскадах эксцизионной репарации ДНК

Table 2. Differentially expressed proteins involved in signaling cascades of DNA excisional repair

Ген Gene	Белок Protein	Контр/ККМ Contr/CUR $p < 0,05$	Сигнальный путь Pathway
<i>APEX1</i>	Нуклеаза APEX1 APEX nuclease 1	5,5	B
<i>MSH6</i>	MutS гомолог 6 MutS homolog 6	7,3	M
<i>PARP1</i>	Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 Poly(ADP-ribose)polymerase 1	2,1	B
<i>PCNA</i>	Ядерный антиген пролиферирующих клеток Proliferating cell nuclear antigen	2,3	M, N, B
<i>POLD1</i>	ДНК-полимераза, дельта 1, каталитическая субъединица Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	18,1	M, N, B
<i>POLE3</i>	ДНК-полимераза, эпсилон 3 (субъединица p17) Polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	25,8	N, B
<i>RFC2</i>	Фактор репликации C (активатор 1) 2 Replication factor C (activator 1) 2	19,4	M, N
<i>RPA2</i>	Белок репликации A2, 32 кДа Replication protein A2, 32kDa	15,1	M, N

Примечание. В — эксцизионная репарация оснований (base excision repair); М — эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair); N — эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair).

Note. B — base excision repair; M — mismatch repair; N — nucleotide excision repair.

к активации скрытой эндонуклеазной активности MutLα и образованию дополнительных разрывов по обе стороны мисмэтча [31].

Куркумин снижает экспрессию PCNA и RFC2 в 2,3 и 19,4 раза соответственно. Восстановление структуры дочерней нити ДНК выполняет POLD1 (ДНК-полимераза дельта 1). Для надежной фиксации POLD1 на цепи также необходимы комплексы PCNA и RFC2 [32]. Под действием ККМ экспрессия POLD1 уменьшается в 18,1 раза. Завершает процесс MMR ДНК-лигаза 1,

соединяющая концы сахарофосфатного остова репарированной дочерней нити ДНК с помощью фосфодиэфирной связи [33].

Эксцизионная репарация оснований (BER). Объектом BER служат неправильно спаренные, алкилированные, окисленные и тому подобные основания. Эта система состоит из мультикаталитических реакций, вызванных ДНК-гликозилазой, эндонуклеазой, полимеразой и ДНК-лигазой. Метилирование N⁷-гуанина и N³-аденина представляют более 90 % метилирования, вызванного ТМЗ, и быстро репарируются BER, способствуя выживанию клеток МГБ [34]. После гликозилазы 1-го типа разрез фосфодиэфирной связи совершает специальная апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза (APEX1) [35]. Согласно данным, представленным в табл. 2, ККМ дезактивирует APEX1, снижая ее экспрессию в 5,5 раза. Среди компонентов системы BER мы идентифицировали белок поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 (PARP1), известный как важный фермент с двойным действием. Ингибирование PARP1 приводит к накоплению дефектных ДНК в опухолевых клетках и их гибели. Таким образом, регуляция активности BER будет способствовать лечению резистентных к темозоломиду МГБ [36]. Под действием ККМ экспрессия PARP1 уменьшалась в 2,1 раза.

На следующем этапе BER происходит заполнение разрыва посредством синтеза ДНК. Он осуществляется по 2 путям — короткозаплаточному (short-patch) и длиннозаплаточному (long-patch) — в зависимости от того, вставляется в ДНК 1 нуклеотид или несколько. Короткозаплаточная BER составляет 80–90 % всей BER.

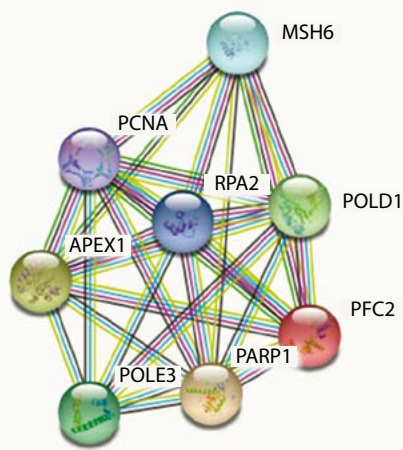


Рис. 2. Белок-белковые взаимодействия 8 дифференциально экспрессированных белков — участников эксцизионной репарации ДНК, полученные с помощью вебсайта STRING

Fig. 2. Protein-protein interactions of 8 differentially expressed proteins — participants in DNA excision repair, obtained using the STRING website

Для длиннозаплаточного BER-пути дополнительно к POLD1, о которой уже упоминалось выше, мы идентифицировали ДНК-полимеразу, эпсилон 3 (POLE3). Являясь PCNA-зависимыми, обе полимеразы осуществляют репарацию ДНК длинными фрагментами [37]. Куркумин оказывает заметное влияние на экспрессию POLE3, снижая ее в 25,8 раза.

Репликационный белок A2 (RPA2). Этот белок является субъединицей комплекса гетеротримерного белка репликации A (RPA), важного для репарации и репликации ДНК. Отмечено, что RPA2 сверхэкспрессируется при различных формах рака [38]. Экспрессия RPA2 понижалась в 15,1 раза после действия ККМ на опухолевые клетки U251 МГБ (см. табл. 2).

Полученные нами данные о действии ККМ на экспрессию белков APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA2 указывают на супрессию эксцизионной репарации ДНК, что, по нашему мнению, может быть использовано при разработке терапевтических схем с участием ККМ для лечения больных МГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия ККМ на протеом линии клеток U251 МГБ человека. Куркумин оказывал существенное влияние на опухолевые клетки. Из 2757 идентифицированных белков 1080 были дифференциально экспрессированными. Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих большую роль в канцерогенезе. В частности, под действием ККМ в клетках U251 наблюдалось снижение эксцизионной репарации ДНК, на что указывало уменьшение экспрессии более чем в 2 раза детерминант сигналингов, ответственных за эксцизионную репарацию ДНК (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA2). Полученные данные могут использоваться в дальнейшем при разработке терапевтических схем с участием ККМ для повышения эффективности стандартных методов лечения больных МГБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Arvold N.D., Reardon D.A. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Clin Interv Aging* 2014;9:357–67. DOI: 10.2147/CIA.S44259.
- Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol* 2018;20:666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209.
- Fabian D., Eibl M.D.P.G.P., Alnahhas I. et al. Treatment of glioblastoma (GBM) with the addition of tumor-treating fields (TTF): a review. *Cancers* 2019;11:1–12. DOI: 10.3390/cancers11020174.
- Kocaadam B., Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015;57(13):2889–95. DOI: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- Kaina B., Christmann M. DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas. *DNA Repair (Amst)* 2019;78:128–41. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.04.007.
- Ferri A., Stagni V., Barilà D. et al. Targeting the DNA damage response to overcome cancer drug resistance in glioblastoma. *Int J Mol Sci* 2020;21(14):4910. DOI: 10.3390/ijms21144910.
- Kotha R.R., Luthria D.L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules* 2019;24(16):2930. DOI: 10.3390/molecules24162930.
- Luthra P.M., Lal N. Prospective of curcumin, a pleiotropic signaling molecule from *Curcuma longa* in the treatment of glioblastoma. *Eur J Med Chem* 2016;109:23–35. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.11.049.
- Hosseini A., Hosseinzadeh H. Antidotal or protective effects of *Curcuma longa* (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: a review. *Biomed Pharmacother* 2018;99:411–21. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.072.
- Amalraj A., Pius A., Gopi S. et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives: a review. *J Tradit Complement Med* 2016;7(2):205–33. DOI: 10.1016/j.jtcme.2016.05.005.
- Meng X., Cai J., Liu J. et al. Curcumin increases efficiency of γ -irradiation in gliomas by inhibiting Hedgehog signaling pathway. *Cell Cycle* 2017;16(12):1181–92. DOI: 10.1080/15384101.2017.1320000.
- Park K.S., Yoon S.Y., Park S.H. et al. Antimigration and anti-invasion effects of curcumin via suppression of fascin expression in glioblastoma cells. *Brain Tumor Res Treat* 2019;7(1):16–24. DOI: 10.14791/btrt.2019.7.e28.
- Maiti P., Scott J., Sengupta D. et al. Curcumin and solid lipid curcumin particles induce autophagy, but inhibit mitophagy and the PI3K-Akt/mTOR pathway in cultured glioblastoma cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(2):399. DOI: 10.3390/ijms20020399.
- Trotta T., Panaro M.A., Prifti E. et al. Modulation of biological activities in glioblastoma mediated by curcumin. *Nutr Cancer* 2019;71(8):1241–53. DOI: 10.1080/01635581.2019.1604978.
- Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А. и др. Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(1):32–40. [Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A. et al. The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):32–40. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23(1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907.
- Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г. и др. Комплексный протеомный анализ «легкой» пептидной фракции препарата церебролизин. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2019;119(8):75–83 [Gromova O.A., Torshin I.Y., Zgoda V.G. et al. An analysis of the peptide composition of a “light” peptide fraction of Cerebrolysin. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry* 2019;119(8):75–83. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro201911908175.
- Cox J., Hein M.Y., Lubner C.A. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*

- 2014;13(9):2513–26. DOI: 10.1074/mcp.M113.031591.
19. Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37(1):1–13. DOI: 10.1093/nar/gkn923.
20. Lee S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* 2016;3:198–210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
21. Fulton B., Short S.C., James A. et al. PARADIGM-2: two parallel phase I studies of olaparib and radiotherapy or olaparib and radiotherapy plus temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma, with treatment stratified by MGMT status. *Clin Transl Radiat Oncol* 2017;8:12–6. DOI: 10.1016/j.ctro.2017.11.003.
22. Xu T., Guo P., He Y. et al. Application of curcumin and its derivatives in tumor multidrug resistance. *Phytother Res* 2020;34(10):2438–58. DOI: 10.1002/ptr.6694.
23. Alexandru O., Georgescu A.M., Ene L. et al. The effect of curcumin on low-passage glioblastoma cells *in vitro*. *J Cancer Res Ther* 2016;12(2):1025–32. DOI: 10.4103/0973-1482.167609.
24. Tomeh M.A., Hadianamrei R., Zhao X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *Int J Mol Sci* 2019;20(5):1033. DOI: 10.3390/ijms20051033.
25. Rodriguez G.A., Shah A.H., Gersey Z.C. et al. Investigating the therapeutic role and molecular biology of curcumin as a treatment for glioblastoma. *Ther Adv Med Oncol* 2016;8(4):248–60. DOI: 10.1177/1758834016643518.
26. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987–96. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
27. Nakada M., Furuta T., Hayashi Y. et al. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol* 2012;2:98. DOI: 10.3389/fonc.2012.00098.
28. Atkins R.J., Ng W., Styli S.S. et al. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *J Clin Neurosci* 2015;22(1):14–20. DOI: 10.1016/j.jocn.2014.09.003.
29. Gu Y., Parker A., Wilson T.M. et al. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* 2002;277(13):11135–42. DOI: 10.1074/jbc.M108618200.
30. Xie C., Sheng H., Zhang N. et al. Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression. *Mol Clin Oncol* 2016;5(2):236–40. DOI: 10.3892/mco.2016.907.
31. Pluciennik A., Modrich P. Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(31):12709–13. DOI: 10.1073/pnas.0705129104.
32. Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair *in vitro*. *J Biol Chem* 1997;272(16):10917–21. DOI: 10.1074/jbc.272.16.10917.
33. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):335–46. DOI: 10.1038/nrm1907.
34. Jiapaer S., Furuta T., Tanaka S. et al. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2018;58(10):405–21. DOI: 10.2176/nmc.ra.2018-0141.
35. Li M., Wilson D.M. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(4):678–707. DOI: 10.1089/ars.2013.5492.
36. Erasmus H., Gobin M., Niclou S. et al. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2016;769:19–35. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.05.005.
37. Matsumoto Y., Kim K., Hurwitz J. et al. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* 1999;274(47):33703–8. DOI: 10.1074/jbc.274.47.33703.
38. Chen C.C., Juan C.W., Chen K.Y. et al. Upregulation of RPA2 promotes NF-κB activation in breast cancer by relieving the antagonistic function of menin on NF-κB-regulated transcription. *Carcinogenesis* 2017;38(2):196–206. DOI: 10.1093/carcin/bgw123.

Благодарность. Масс-спектрометрические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н. Ореховича

Acknowledgment. Mass-spectrometry measurements were performed using the equipment of “Human Proteome” Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia)

Вклад авторов

Т.И. Кушнир: подготовка образцов для анализа;
 Н.Е. Арноцкая: статистический анализ данных, редактирование черновика рукописи;
 И.А. Кудрявцев: получение протеома клеток мультиформной глиобластомы;
 А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;
 А.Х. Бекашев: научное редактирование статьи;
 В.Г. Згода: получение масс-спектрометрических данных;
 В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions

T.I. Kushnir: preparation of samples for analysis;
 N.E. Arnotskaya: statistical data analysis, draft editing manuscripts;
 I.A. Kudryavtsev: obtaining proteome of glioblastoma multiforme cells;
 A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;
 A.K. Bekyashev: scientific editing of the article;
 V.G. Zgoda: obtaining mass spectrometric data;
 V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>

Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>

А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>

А.Х. Бекашев / A.K. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>

В.Г. Згода / V.G. Zgoda: <https://orcid.org/0000-0002-4532-4274>

В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.

Funding. It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.