

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА NRF2 КЛЕТКИ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАКОВЫХ ОПУХОЛЕЙ

Г.Г. Гольшев¹, К.В. Тикунова¹, О.А. Зайцев¹, Ю. Дини², А.Н. Гольцов¹

¹ МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

² Федеральный университет Дутсе, Нигерия

NRF2 ANTIOXIDANT CELLULAR SYSTEM AS A THERAPEUTIC TARGET FOR ENHANCING CANCER RADIOSENSITIVITY

G.G. Golyshev¹, K.V. Tikunova¹, O.A. Zaytsev¹, Y. Deene², A.N. Goltsov¹

¹ MIREA - Russian technological university, Moscow, Russia

² Federal University Dutse, Nigeria

Содержание

1. Введение
2. Молекулярные механизмы функционирования антиоксидантной системы NRF2 клетки
3. Активация антиоксидантной системы NRF2 в раковых клетках при окислительном стрессе, вызванном действием ионизирующего излучения
4. Активация антиоксидантной системы NRF2 раковых клеток как фактор радиорезистентности
5. Антиоксидантная система NRF2 клетки как мишень таргетной терапии для повышения радиочувствительности раковых клеток
6. Заключение

Ключевые слова: радиорезистентность, радиотерапия, транскрипционный фактор NRF2, антиоксидантная система, таргетная терапия

Contents

1. Introduction
2. Molecular mechanisms of the cellular NRF2 antioxidant system function
3. Activation of the NRF2 antioxidant system in cancer cells under oxidative stress caused by ionizing irradiation
4. Activation of NRF2 as a factor of radioresistance
5. NRF2 antioxidant system of the cell as a target of targeted therapy to increase radiosensitivity of cancer cells
6. Conclusion

Key words: radioresistance, radiotherapy, transcription factor NRF2, antioxidant system, targeted therapy

E-mail: gggolyshev@gmail.com

<https://doi.org/10.52775/1810-200X-2025-105-1-94-109>

1. Введение

При выборе режимов радиотерапии (РТ) онкологических пациентов важной задачей является определение степени радиочувствительности (РЧ)/радиорезистентности (РР) злокачественной опухоли, что существенно влияет на выбор подводимой дозы, числа фракций в курсе лечения, а также на выбор комбинированной РТ в сочетании с химио- и таргетной терапиями. Разработка методов подавления механизмов РР раковых клеток является одним из наиболее востребованных направлений в клинической радиобиологии. Перспективные исследования в этой области ведутся по определению эффективных комбинаций радиотерапии с персонализированными лекарственными терапиями, направленными на ингибирование определенных метаболических и сигнальных путей, активность которых повышена в раковых клетках в результате онкомутаций. На решение проблемы РР направлены многочисленные исследования, которые позволили выяснить основные молекулярные механизмы снижения радиочувствительности злокачественных новообразований и определить основные сигнальные и метаболические пути, мутации в которых вызывают РР [1]. В результате этих исследований были разработаны методы комбинированной РТ, основывающиеся на данных генетической и молекулярной диагностики пациентов, что позволяет повысить эффективность лучевой терапии путем подавления радиорезистентности и повышения индекса радиочувствительности многих видов рака [2].

Одним из сигнальных путей раковых клеток, который активируется при канцерогенезе, является сигнальный путь антиоксидантной системы клетки [3]. Это связано с высоким уровнем генерации активных форм кислорода (АФК) во многих линиях раковых клеток, что обусловлено повышенной метаболической и пролиферативной активностью раковых клеток, а также дисфункцией митохондрий в опухолевых клетках и онкомутациями, приводящими к возрастанию внутриклеточного уровня АФК [4, 5].

С одной стороны, функционирование многих типов раковых клеток и опухолей происходит при постоянном оксидативном стрессе (ОС), что ведет к повышенной активности многих редокс-чувствительных белков и рецепторов, входящих в различные сигнальные пути

пролиферации раковых клеток, например, PTEN, EGFR, многих протеинкиназ и др. Это способствует росту опухоли, сопровождающееся дальнейшим развитием канцерогенеза за счет новых мутаций ДНК. Высокий уровень АФК в ряде линий раковых клеток положительно коррелирует с агрессивным течением болезни [6].

С другой стороны, повышенный уровень АФК и ОС вызывает повреждение ДНК, окисление белков и липидов, что ведет к хромосомным aberrациям и гибели клеток. Способность многих линий раковых клеток функционировать в условиях ОС определяется повышенной антиоксидантной защитой раковых клеток, которая запускает механизм клеточной адаптации опухолевых клеток к ОС [7].

Адаптация к ОС в раковых клетках реализуется за счет эндогенной антиоксидантной системы (АОС) защиты клетки, активация которой вызывает экспрессию ряда антиоксидантных ферментов, катализирующих деградацию АФК. Одна из ключевых защитных АОС клетки находится под управлением редокс-чувствительного транскрипционного фактора (ТФ) NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [8]. ТФ NRF2 является ключевым регулятором АОС клеток и контролирует экспрессию многих антиоксидантных ферментов [3]. NRF2-редокс-чувствительный ТФ регулирует сигнальную систему, защищающую клетки и ткани от токсинов, окислительного стресса и канцерогенов [9]. Мыши, выращенные с мутацией в гене Nrf2, проявляют меньшую устойчивость к окислительному стрессу по сравнению с мышами с нормально функционирующей АОС [10].

Активация АОС NRF2 была обнаружена во многих линиях раковых клеток и опухолях [5, 11, 12]. В большинстве случаев активация АОС NRF2 обусловлена процессами адаптации раковых клеток к окислительному стрессу, который испытывают раковые клетки. При этом раковые клетки, функционирующие в условиях окислительного стресса находятся в зависимости от АОС NRF2 защиты клетки, что делает сигнальный путь ТФ NRF2 перспективной фармакологической терапевтической мишенью в лекарственной онкотерапии [9, 13]. В настоящее время NRF2-редокс-чувствительная система раковых клеток рассматривается как перспективная терапевтическая мишень для разработки как активаторов, так и ингибиторов системы активации ТФ NRF2 для различных заболеваний, включая онкологию (см. обзоры

[9, 14–18]). В систематическом обзоре Зенкова Н.К. с соавторами [9] обсуждаются фармакологические активаторы АОС NRF2 и анализируются результаты их применения в терапии сердечно-сосудистых заболеваний в качестве кардиопротекторных препаратов. В обзоре Кормана Д.Б. и др. [19] подробно анализируются методы ингибирования ферментов АОС NRF2 раковых клеток как перспективное направление таргетной терапии рака.

В настоящем обзоре обсуждается роль АОС NRF2 раковых клеток при действии лучевой терапии и приводятся данные о перспективности рассмотрения блокировки АОС NRF2 раковых клеток как таргетной терапии, усиливающей радиочувствительность опухоли и повышающей эффективность РТ. Учитывая, что действие лучевой терапии непосредственно направлено на генерацию АФК в клетке с последующим оксидативным стрессом, приводящим к гибели раковых клеток, предполагается, что активация АОС NRF2 в результате адаптивного ответа раковых клеток на ОС при радиотерапии является одним из механизмов радиорезистентности и защиты клеток опухоли от повреждений, вызванных радиацией [20].

В обзоре кратко обсуждаем молекулярные механизмы функционирования клеточной АОС, которая находится под контролем ТФ NRF2. Анализируются результаты экспериментальных и клинических исследований по активации АОС NRF2 при действии ионизирующего излучения (ИИ) в различных клеточных линиях рака и приводятся основные мутации в АОС NRF2, ведущие к активации защитной системы в раковых клетках. Обсуждаются результаты экспериментов по исследованию влияния подавления активности АОС NRF2 на эффективность лучевой терапии.

2. Молекулярные механизмы функционирования антиоксидантной системы NRF2 клетки

АФК образуются в клетках и органах как побочные продукты ферментативных реакций в метаболических процессах, а также генерируются как агенты, выполняющие определенные физиологические функции, например, при воспалении. Одним из основных источников АФК в клетках является дыхательная цепь в митохондриях. Будучи продуктами ферментатив-

ных реакций, идущих с участием свободных радикалов, АФК выполняют роль сигнальных молекул для многих клеточных процессов (апоптоз, пролиферация, Ca^{2+} сигналинг и др.), которые контролируются редокс-чувствительными белками, содержащими цистеиновые остатки в своей структуре. В большинстве своем АФК выполняют роль стрессового сигнала. В нормальных условиях жизнедеятельности клеточный уровень АФК поддерживается на низком уровне за счет баланса между генерацией АФК и детоксикацией АФК одной из ключевых АОС клеток, находящейся под управлением ТФ NRF2.

Согласно молекулярному механизму, установленному к настоящему времени, одним из основных элементов NRF2 антиоксидантной системы клетки является комплекс ТФ NRF2 с репрессорным белком KEAP1 (Kelch-like ECH associating protein) [21]. В нормальных редокс условиях клетки происходит связывание *de novo* синтезированного ТФ NRF2 с димером адаптерного белка, KEAP1, который реализует взаимодействие NRF2 с убиквитин-лигазным комплексом CUL3-E3 и его последующим убиквитинированием и деградацией в протеасомах (см. схему на рис. 1). Это приводит к низкой концентрации синтезированного ТФ NRF2 в цитоплазме и ядре клетки за счет постоянного убиквитинирования и деградации NRF2. Низкий уровень ТФ NRF2 в клеточном ядре обеспечивает конститутивную экспрессию белков антиоксидантной системы, находящихся под управлением NRF2.

При окислительном стрессе или атаке электрофилов согласно модели “петли и крючка” (hinge and latch) происходит окислительная модификация сульфгидрильных групп остатков цистеина в KEAP1, приводящее к конформационному изменению в структуре димерного комплекса KEAP1, связанного с NRF2 [21]. В результате этого изменяется связывание NRF2 с димером KEAP1: рвется связь одной молекулы KEAP1 с низкоаффинным мотивом (DLG мотив, “крючок”) NRF2, и NRF2 остается связанным только со второй молекулой димера KEAP1 посредством высокоаффинного мотива (ETGE мотив, “петля”). При этой конформации нарушается убиквитинирование NRF2, а димер KEAP1 оказывается заблокирован от связывания с новыми молекулами NRF2. Это приводит к блокировке KEAP1-зависимой деградации NRF2 и, как следствие, к увеличению концентрации NRF2 в цитоплазме клетки за счет вновь синте-

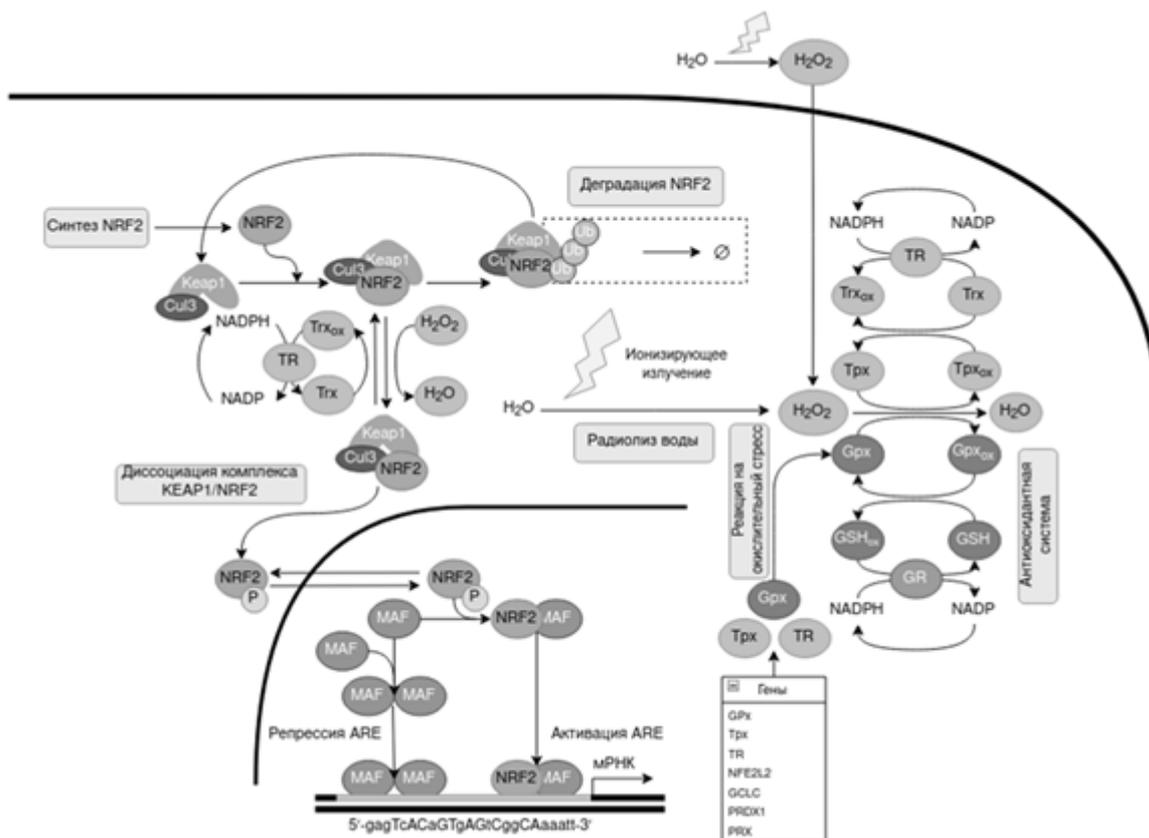


Рис. 1. Схема антиоксидантной системы NRF2-KEAP1-ARE клетки

зированных молекул. Усиление транспорта ТФ NRF2 в ядро клетки и его накопление в ядре ведет к транскрипции генов, находящихся под управлением NRF2 (рис. 1). Таким образом, комплекс NRF2-CUL3-KEAP1 выполняет роль сенсора окислительного стресса в клетке.

Свободный ТФ NRF2 переходит из цитоплазмы в ядро клетки и связывается с малыми белками мышечно-апоневротической фибросаркомы (sMAF-F, sMAF-G, sMAF-K) с образованием транскрипционно-активного гетеродимера NRF2-sMAF, который в свою очередь связывается с промоторами генов-мишеней, содержащими в своих последовательностях антиоксидант-респонсивный элемент ARE (antioxidant responsive element) [21] (см. рис. 1). В противоположность этому образование гомодимера sMAF-sMAF приводит к формированию репрессорного комплекса при связывании с ARE последовательностью. Таким образом, конкуренция NRF2 за связывание с sMAF и формирование активаторного (NRF2-sMAF) и репрессор-

ного (sMAF-sMAF) комплексов является еще одной стадией контроля активации NRF2 АОС.

Транскрипционный комплекс NRF2-sMAF-ARE контролирует экспрессию многих антиоксидантных ферментов, таких как глутатионпероксидаза (GPx), глутатионредуктаза (GR), тиоредоксин (TRX), тиоредоксин редуктаза (TR) и др. Под его управлением находятся ферменты синтеза глутатиона (GSH), являющегося восстановительным субстратом многих антиоксидантных ферментов. Последовательность ARE найдена также в промоторе гена NFE2L2, кодирующего непосредственно сам ТФ NRF2, а также в промоторах генов sMAF и KEAP1, что обеспечивает положительную и отрицательную связи в АОС NRF2 [22].

При окислительном стрессе NRF2-зависимая экспрессия антиоксидантных ферментов приводит к падению внутриклеточного уровня АФК и восстановлению KEAP1, что обеспечивает образование комплекса NRF2-CUL3-KEAP1, деградацию NRF2 и завершение клеточного ответа на ОС (рис. 1).

Как видно, АОС NRF2 является сложной системой управления клеточного редокс-баланса, в которой можно выделить сенсорную подсистему, подсистему преобразования сигналов, систему молекулярных контроллеров и исполнительную систему. Все подсистемы связаны многочисленными положительными и отрицательными обратными связями, обеспечивающими быстрый и строгий контроль уровня АФК в клетке с элементами усиления сигналов. Для разработки эффективного терапевтического воздействия на редокс-состояние клетки путем комбинации лекарственной и лучевой терапий необходимо детальное понимание молекулярных механизмов ее функционирования. Наряду с экспериментальными исследованиями в этом направлении ведутся теоретические работы по математическому моделированию АОС NRF2 методами системной биологии [23–25].

3. Активация антиоксидантной системы NRF2 в раковых клетках при окислительном стрессе, вызванном действием ионизирующего излучения

Основным механизмом действия лучевой терапии является повреждение молекул ДНК раковых клеток в прямых и непрямых процессах, индуцированных ионизирующим излучением. Более 70 % разрывов ДНК идет за счет непрямых процессов генерации АФК при радиолитической реакции в клетке. При возрастании уровня АФК в клетках происходит активация антиоксидантной системы защиты клетки, в частности, системы, контролируемой ТФ NRF2. Увеличение концентрации пероксида водорода H_2O_2 приводит к окислению молекул KEAP1 в комплексе NRF2-KEAP1-CUL3 и частичной диссоциации NRF2, что ведет к прекращению деградации ТФ NRF2 и его увеличению его концентрации в клетке (рис. 1). Аккумуляция ТФ NRF2 в клеточном ядре и его связывание с ARE последовательностями в промоторах генов ферментов АОС запускает экспрессию многочисленных антиоксидантных ферментов, катализирующих деградацию АФК. Возникновение радиорезистентности, индуцированной активацией АОС NRF2 было обнаружено во многих линиях раковых клеток [26–28]. В клинических испытаниях также было показано, что повы-

шенная экспрессия NRF2 во многих типах раковых опухолей дает вклад в их радиорезистентность и может являться прогностическим маркером низкой выживаемости пациентов [29].

Возрастание активности АОС NRF2 при действии ИИ в экспериментах обычно определяется по экспрессии белков, находящихся под управлением ТФ NRF2. В большинстве работ измерялась экспрессия фермента NAD(P)H дегидрогеназы (NQO1), гемоксигеназы-1 (HO-1), глутатион S-трансферазы A2 (GST2) и других ферментов, которые считаются маркерами активации АОС NRF2 [26]. Также возрастание транскрипционной активности NRF2 определяется по изменению сигнала ARE-люциферазного репортера [30]. Во многих исследованиях роли активации АОС NRF2 в развитии радиорезистентности проводились сравнения ответов исходных раковых клеток на ИИ и ответов клеток с генной модификацией, в которых наблюдалась активация или блокировка экспрессии NRF2 [20].

Исследование роли АОС NRF2 в механизмах развития радиорезистентности в клеточных линиях немелкоклеточного рака лёгких (НМРЛ) A549 и H460 показали конститутивную активацию защитной антиоксидантной системы [26]. Это было определено по повышенной экспрессии ряда генов, находящихся под управлением ТФ NRF2: NQO1, GCL, GSR, TXN и TXNRD1. Ингибирование ТФ NRF2 с помощью трансфекции NRF2 siRNA вызвало подавление экспрессии этих генов примерно на 50 %, что привело к существенному возрастанию уровня АФК в трансфицированных клетках после 24 часов после облучения с дозой 10 Гр. Измерение дозовой зависимости выживаемости клеток показало усиление радиочувствительности клеток при ингибировании экспрессии NRF2.

На рис. 2а и б мы привели экспериментальные дозовые зависимости для обеих линий клеток и построили аппроксимирующие кривые в соответствии с линейно-квадратичной (ЛК) моделью [31]. Расчет отношения α/β , характеризующего радиочувствительность клеток, показал возрастание радиочувствительности NRF2 siRNA трансфицированных клеток ($\alpha/\beta=2,2$ Гр для A549-siRNA и $\alpha/\beta=1,0$ Гр для H460-siRNA) по сравнению с дочерними клетками ($\alpha/\beta=0,2$ Гр для A549 и $\alpha/\beta=0,11$ Гр для H460). В этой же работе исследовалось влияние нокаутов генов *Keap1* и *Nrf2* на радиочувствительность линии клеток фибробластов

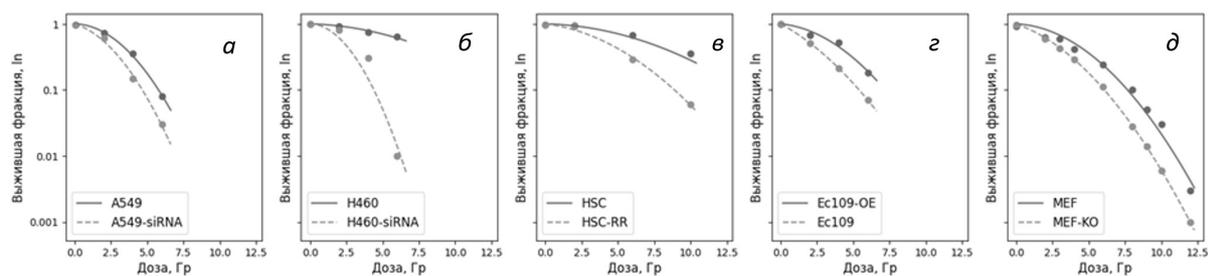


Рис. 2. Дозовые зависимости выживаемости клеток при ингибировании NRF2 в клеточных линиях немелкоклеточного рака лёгких A549 и A549-siRNA (а) и H460-siRNA [26] (б); в клетках плоскоклеточного рака полости рта HSC и HSC-RR [27] (в); в клетках плоскоклеточного рака пищевода Ec109 и Ec109-OE [28] (г); в клетках фибробластов мышей MEF и MEF-KO [34] (д); точки – экспериментальные данные, линии – аппроксимирующие кривые ЛК модели

мышей (MEF). Измерение дозовых зависимостей показало возрастание радиочувствительности клеток с двойным нокаутом *Keap1*^{-/-} по сравнению с диким типом и клеток с нокаутами *Keap1*^{-/-}, *Nrf2*^{-/-} и нокаутом *Nrf2*^{-/-}. Нокаут *Keap1*^{-/-} привел к накоплению NRF2 в ядре клетки и активации АОС, что было подтверждено возрастанием экспрессии генов, находящихся под управлением ТФ NRF2. Результаты измерения дозовых зависимостей показали уменьшение радиочувствительности клеток с нокаутом *Keap1*^{-/-}. Измерение роста популяции клеток выявило высокую скорость роста популяции клеток *Keap1*^{-/-} по сравнению с дочерними клетками и клетками с нокаутом *Nrf2*^{-/-}, что может быть обусловлено высокой степенью активации АОС NRF2.

В клеточных линиях рабдомиосаркомы человека RD (ERMS) и RH30 (ARMS) возрастание АФК (супероксида анион-радикала в митохондриях), экспрессия NRF2 мРНК и генов, кодирующих ферменты АОС (супероксиддисмутаза (SOD-2), каталазы (CAT), GPx4 и др.), были зарегистрированы сразу после облучения клеток протонным пучком с дозами 1 Гр – 5 Гр [20]. Ингибирование экспрессии *NFE2L2* (NRF2) гена при трансфекции клеток NRF2 miRNA привело к существенному возрастанию уровня АФК и усилению их радиочувствительности по сравнению с клетками с функционирующей АОС NRF2.

Возрастание экспрессии NRF2 и его активной фосфорилированной формы pNRF2 было обнаружено в клетках плоскоклеточного рака полости рта HSC с индуцированной радиорезистентностью (HSC-RR). Радиорезистентные клетки были получены путем постепенного воздействия возрастающих доз рентгеновского излучения с мощностью 0,5–2 Гр/день [27]. В

радиорезистентных клетках HSC-RR было зарегистрировано усиление NRF2-зависимого гликолиза и синтеза глутатиона. На рис. 2в приведено сравнение дозовых зависимостей выживаемости клеток HSC и HSC-RR, которое показывает уменьшение отношения α/β у резистентных клеток HSC-RR по сравнению с дочерними клетками HSC ($\alpha/\beta=1,0$ Гр для HSC-RR и $\alpha/\beta=2,7$ Гр для HSC). В клинических исследованиях пациентов с плоскоклеточным раком полости рта иммуногистохимический анализ показал повышение экспрессии pNRF2 после сеансов предоперационной химио- и радиотерапии. Анализ данных по общей выживаемости (overall survival) пациентов выявил более низкую выживаемость с высокой экспрессией pNRF2, чем у пациентов с низкой экспрессией pNRF2. Данные по выживаемости без прогрессирования заболевания (progression free survival) показали, что высокая экспрессия pNRF2 может являться прогностическим маркером низкой 5-летней выживаемости пациентов с этой патологией [27].

Эффект повышенной экспрессии NRF2 на радиочувствительность клеток был исследован на клетках плоскоклеточного рака пищевода (ПКРП) Ec109 и KYSE-30, в которые был внесен лентивирусный вектор с геном *NFE2L2* (Ec109-OE) [28]. Измерение дозовых зависимостей клоногенной выживаемости клеток показало, что клетки с повышенной экспрессией NRF2 (Ec109-OE и KYSE-30-OE) проявляли более низкую радиочувствительность ($\alpha/\beta=1,3$ Гр для Ec109-OE клеток) по сравнению с дочерними клетками ($\alpha/\beta=9,8$ Гр для Ec109 клеток) (рис. 2г). Видно, что значение отношения α/β переходит из области, характерной для РЧ клеток в область РР клеток [32]. Предполагается, что одним из механизмов приобретенной ра-

диорезистентности клеток с повышенной экспрессией NRF2 является возрастание экспрессии Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaMKII), в промоторе которого обнаружена ARE последовательность связывания с TF NRF2. Предполагается, что NRF2-зависимая экспрессия CaMKII приводит к активации аутофагии – процесса деградации внутриклеточных компонентов в лизосомах, а также к деградации молекул АФК при их повышенном уровне. Анализ выживаемости пациентов с ESCC показал, что высокий уровень экспрессии NRF2 и CaMKII ведет к значительному сокращению выживаемости пациентов и является прогностическим фактором тяжелого течения болезни. Таким образом радиорезистентность клеток плоскоклеточного рака пищевода может быть связана с NRF2-зависимой экспрессией CaMKII и активацией аутофагии, приводящей к деградации молекул АФК и защите раковых клеток от окислительного стресса при лучевой терапии.

Повышение экспрессии NRF2 после облучения было также обнаружено с помощью иммуногистохимического анализа в тканях глиомы пациентов, которое сопровождалось возрастанием уровня белка гипоксии HIF-1 α [30]. В *in vitro* экспериментах была подтверждена повышенная экспрессия NRF2 при действии ИИ с дозами 1 Гр – 8 Гр на клетки линий глиомы человека U251 и U87, выращенных в условиях гипоксии. Дозозависимая экспрессия NRF2 измеренная по сигналу ARE-люциферазного репортера была зарегистрирована только на 4-й день после облучения в клетках, выращенных как в условиях гипоксии, так и нормоксии. Нокаут *NFE2L2* гена привел к возрастанию радиочувствительности клеток по сравнению с дочерними клетками, что коррелировало с существенным возрастанием уровня АФК, падением экспрессии NRF2-зависимых ферментов (NQO1 и NO1) и синтезом GSH в трансфицированных клетках. Отметим, что в настоящее время отсутствует объяснение молекулярного механизма обнаруженной задержки активации NRF2 при действии ИИ в ряде клеточных линий.

В исследованиях NRF2-зависимой радиорезистентности был обнаружен процесс гибели раковых клеток, отличный от апоптоза, а именно ферроптоз, заключающийся в программированной гибели клетки за счет перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран в присутствии атомов железа Fe²⁺ [33]. Иммуногистохимический анализ тканей плос-

коклеточного рака пищевода (ПКРП) у 127 пациентов выявил повышенную экспрессию NRF2 и NRF2-зависимого транспортера цистина/глутамата (SLC7A11), который играет важную роль в синтезе GSH и является ингибитором ферроптоза. Пациенты с повышенной экспрессией NRF2 и SLC7A11 имели более низкие показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования заболевания. Для подтверждения роли ферроптоза в гибели клеток были выполнены эксперименты на линиях клетках ПКРП KYSE30 и KYSE150, в которых с помощью генной модификации был повышен уровень экспрессии NRF2. Результаты экспериментов по облучению клеток показали, что в модифицированных клетках уровни АФК, ПОЛ и ферроптоза были более низкими, чем в дочерних клетках. Было также показано, что радиорезистентность в клетках ПКРП обусловлена NRF2/SLC7A11-зависимым ингибированием ферроптоза.

Исследование действия ИИ на активацию АОС NRF2 в нераковых клетках было выполнено в экспериментах на клетках фибробластов мышцей (WT MEF), в которых обнаружено дозозависимое повышение АФК и ARE транскрипционной активности NRF2 на пятые сутки после облучения [34]. Измерение базального уровня АФК в клетках WT MEF и в клетках с нокаутом *Nrf2* (MEF-KO) показало повышенный уровень АФК в MEF-KO клетках по сравнению с уровнем в WT MEF клетках. Действие ИИ с дозами 8 Гр и 10 Гр вызывало двукратный подъем АФК с задержкой, в то время как в MEF-KO клетках наблюдалось повышение АФК более, чем в 10 раз сразу после облучения. Таким образом блокировка АОС NRF2 в MEF-KO клетках привела к неуправляемому радиационно-индуцированному повышению АФК, в то время как в WT MEF клетках NRF2 АОС поддерживала низкий уровень АФК во время облучения. Также в этой работе было обнаружено повышение уровней ферментов-маркеров активации NRF2 АОС (HO-1 и GSTA2), для которых также была зарегистрирована задержка экспрессии на пять дней. На рис. 2д приведено сравнение дозовых зависимостей клоногенной выживаемости WT MEF и MEF-KO клеток, которое показывает, что блокировка NRF2 АОС у MEF-KO клеток повышает радиочувствительность по сравнению с клетками WT MEF с функционирующей NRF2 АОС ($\alpha/\beta=5,3$ Гр для MEF-KO и $\alpha/\beta=0,7$ Гр для WT MEF). Похожие результаты в этой работе были получены для нераковых кле-

точных линий фибробластов NIH-3T3 и дендритных клеток DC2.4.

4. Активация антиоксидантной системы NRF2 раковых клеток как фактор радиорезистентности

Проведенный в предыдущем разделе анализ экспериментальных и клинических исследований показал, что во многих линиях раковых клеток ионизирующее излучение вызывает активацию АОС NRF2, что приводит к ослаблению радиочувствительности раковых клеток. При этом было обнаружено, что при блокировке ТФ NRF2 можно обратимо усилить радиочувствительность. Учитывая эти результаты, в данном разделе мы анализируем исследования по радиочувствительности различных линий раковых клеток и тканей злокачественных опухолей, в которых были обнаружены генетические мутации или эпигенетические модификации в белках АОС NRF2, вызывающие активацию АОС и адаптацию клеток опухоли к окислительному стрессу, индуцированному ионизирующим излучением.

Повышенная базальная экспрессия ТФ NRF2 была обнаружена в клетках карциномы предстательной железы DU145 [35]. При анализе данных клоногенной выживаемости клеток при облучении с дозами 4 Гр и 8 Гр зарегистрировано уменьшение повреждений молекул ДНК и низкая радиочувствительность этой линии клеток по сравнению с радиочувствительной клеточной линией карциномы предстательной железы PC3, обладающей более низкой экспрессией ТФ NRF2. Исследование окислительно-восстановительного статуса клеток выявило низкий базальный уровень АФК в клетках DU145, а также его пониженный уровень при облучении. Установлено, что это связано с повышенным уровнем экспрессии гена NFE2L2 и NRF2-зависимых генов (GCLC, HO1 и TXRD1) в радиорезистентных DU145 клетках по сравнению с радиочувствительной клеточной линией PC3. Также в клетках DU145 наблюдались более высокие базальные уровни GSH и отношения GSH/GSSG, чем в клетках PC3, что коррелировало с высокой экспрессией фермента GCLC, участвующего в синтезе GSH. Измерение базальной экспрессии KEAP1, регулирующего деградацию NRF2 (см. рис. 1), показало более низкий его уровень в DU145 клетках, чем в PC3, и облучение клеток привело к дальнейшему

уменьшению его экспрессии. В исследованиях удалось подавить радиорезистентность клеток DU145 с помощью нокаута гена NFE2L2, а также используя ингибиторы NRF2 или HO1. Таким образом активация АОС NRF2 в клетках карциномы предстательной железы, вызванная повышенной экспрессией NRF2 или пониженной экспрессией KEAP1, приводит к усилению восстановительного статуса клеток при облучении и индуцирует их радиорезистентность.

Детальное исследование роли мутаций в системе NRF2/KEAP1 в развитии радиорезистентности проведено для плоскоклеточного рака легких (ПКРЛ). Мутации в этой системе были найдены в 30 % исследованных пациентов, у которых обнаружена высокая степень агрессивности опухоли с высоким риском развития рецидива и отдаленных метастазов после сеансов лучевой терапии [36]. Роль этих мутаций была исследована в клетках P-LSCC с делецией гена *Trp53* и двойной делецией генов *Keap1* и *Trp53* (K/P-LSCC) рака ПКРЛ у мышей. Эксперименты были проведены *in vitro* на популяции этих клеток и в *in vivo* экспериментах на мышах с опухолями, выращенными при трансплантации этих клеток. Повышенная активация ТФ NRF2 была зарегистрирована в клетках K/P-LSCC по сравнению с P-LSCC клетками, которая сопровождалась экспрессией NRF2-зависимых ферментов АОС и понижением уровня АФК. Для клеток с делецией гена *Keap1* и *Trp53* была характерна высокая скорость пролиферации и метастазирования. Клоногенный анализ выживаемости клеток при действии ионизирующего излучения с дозами 1 Гр – 10 Гр показал более высокую радиорезистентность клеток K/P-LSCC, чем P-LSCC. При этом было обнаружено значительно меньшее количество повреждений молекул ДНК в клетках с делецией гена *Keap1*. Эти результаты были подтверждены в *in vivo* экспериментах, которые показали существенное ослабление поражающего действия облучения с дозой 6 Гр на рост опухоли K/P-LSCC у мышей, чем с P-LSCC опухолью.

В этой же работе [36] был предложен метод подавления радиорезистентности в клетках ПКРЛ с делецией гена *KEAP1*. В клетках K/P-LSCC была зарегистрирована повышенная экспрессия гена транспортера цистин/глутамата *SLC7A11*, который, как обсуждалось ранее, находится под управлением ТФ NRF2 и кодирует белок, выполняющий важную роль в

синтезе GSH. Ингибирование системы импорта цистеина сульфасалазином привело к сенсбилизации K/P-LSCC клеток к ионизирующему излучению и восстановлению радиочувствительности, характерной для дочерних клеток.

На основе полученных результатов в *in vitro* и *in vivo* экспериментах были выполнены клинические исследования на 42 пациентах с ПКРЛ I–III стадий, проходящих курс лучевой терапии [36]. Были отобраны пациенты с мутациями гена *Keap1*, большинство из которых присутствовали в домене Kelch, ответственным за связывание NRF2. Локализованные рецидивы в этой группе были зарегистрированы у 70 % пациентов по сравнению с 18 % пациентов в группе без мутаций в АОС NRF2/KEAP1. С целью неинвазивного определения пациентов с мутациями гена *Keap1* был проведен анализ крови на циркулирующую ДНК (ctDNA) раковых клеток, в результате чего были идентифицированы пациенты с мутацией *Keap1*. Результаты лучевой терапии этой группы пациентов показали значительно высокий уровень рецидивов.

Клиническая значимость сигнальной системы NRF2/KEAP1 в онкологии подтверждается высокой частотой мутаций в генах *NFE2L2* и *KEAP1*, обнаруженных в клетках и тканях опухолей многих видов рака. Было показано, что мутации NRF2/KEAP1, приводящие к активации АОС в раковых клетках, обуславливают *de novo* резистентность клеток к препаратам химиотерапии, действие которых, в частности, направлено на генерацию АФК с последующим повреждением ДНК (цисплатин, эпопозид, паклитаксел, бортезомиб, гемцитабин, 5-фторурацил и др.). Также была продемонстрирована возможность успешного подавления резистентности путем ингибирования АОС NRF2/KEAP1. На основе приведенных в настоящем обзоре результатов исследований можно предполагать, что многие мутации в АОС NRF2/KEAP1, найденные в раковых клетках и тканях, будут также давать существенный вклад в адаптацию опухоли к ионизирующему излучению и в ее радиорезистентность, которая в свою очередь может быть подавлена блокировкой АОС NRF2/KEAP1 терапевтическими препаратами. Ниже мы приведем основные типы мутации в системе NRF2/KEAP1, обнаруженные при различных видах рака.

Главными молекулярными механизмами повышения экспрессии ТФ NRF2 в раковых клетках являются следующие: соматические мутации генов *KEAP1* или *NFE2L2* (NRF2); эпиге-

нетические модификации гена *KEAP1*, приводящие к подавлению его экспрессии; экспрессия микроРНК, регулирующих NRF2 и KEAP1 на посттрансляционном уровне; повышенная экспрессия и аккумуляция белков, конкурирующих с NRF2 за связывание с KEAP1 [37].

Изначально соматические мутации гена *KEAP1* были обнаружены в образцах опухолевых тканей (19 %) и клеточных линиях рака легких (50 %), которые являются вторыми по распространенности и значимости генетическими изменениями при раке легких [38]. Также мутации *KEAP1* были обнаружены в других видах рака человека, таких как рак яичников (19 %) [39], рак простаты (8 %) [40], желудка (11 %), печени (9 %), толстой кишки (8 %) и молочной железы (2 %) [41]. Эти мутации, обнаруженные в нескольких доменах *KEAP1*, приводят к инактивации KEAP1 с последующим накоплением NRF2 в клеточном ядре, ведущим к активации АОС NRF2/KEAP1 раковых клеток.

Наиболее распространенным видом генетических изменений, влияющих на функцию комплекса KEAP1-NRF2 в солидных опухолях, являются точечные мутации с потерей гетерозиготности. Они обычно возникают в экзонных областях, которые кодируют домены Kelch в KEAP1, отвечающие за связывание KEAP1 и NRF2, и домены IVR и VTB, содержащие цистеиновые основания и отвечающие за редокс-регуляцию NRF2. Также эти мутации вызывают общий сбой процесса убиквитинирования NRF2, опосредованного KEAP1. В клетках НМРЛ с мутациями указанного типа наблюдалась высокая экспрессия NRF2-зависимых ферментов АОС и резистентность к препаратам химиотерапии [38].

Соматические мутации *NFE2L2* происходят в основном в мотиве ETGE (57 %) или DLG (43 %), которые приводят к диссоциации комплекса KEAP1-NRF2. При мутации в мотиве ETGE ослабевает высокоаффинное взаимодействие между KEAP1 и NRF2, в то время как мутации в мотиве DLG приводят к ослаблению низкоаффинного взаимодействия. Указанные мутации были выявлены в клетках образцов тканей пациентов с папиллярной почечно-клеточной карциномой, в которых обнаружена повышенная экспрессия NRF2-зависимых ферментов [42]. Также были найдены мутации делеции в гене убиквитин-лигазы CUL3, приводящие к полной потере функции фермента, что вызвало прекращение деградации NRF2, ведущее к его накоплению и активации АОС.

Повышенный уровень мутаций NRF2 в клетках эндометриальной карциномы был обнаружен с помощью иммуногистохимических исследований многочисленных образцов тканей злокачественных и доброкачественных опухолей [43]. Дальнейшее исследование показало резистентность клеток эндометриальной карциномы к препаратам химиотерапии (цисплатин, паклитаксел), вызывающих окислительный стресс в клетках. Ингибирование NRF2 привело к уменьшению опухоли при действии препаратов химиотерапии в мышцах с ксенотрансплантацией линии раковых клеток эндометриальной карциномы.

Еще один механизм активации ТФ NRF2 состоит в повышении его экспрессии за счет связи АОС NRF2 с другими сигнальными клеточными путями, которые активированы в раковых клетках за счет онкомутаций [44, 45]. Так, в тканях карциномы легких экспрессия гена *NFE2L2* в 20–30 % случаев связана с активацией MAPK сигнального пути пролиферации при мутации в онкогене *KRAS*, коррелируя с химиорезистентностью [45]. На ксеногенных опухолевых мышечных моделях с выращенной опухолью рака HMP1 с мутацией гена *KRAS* было показано, что активация NRF2 происходит благодаря *KRAS*-индуцированному повышению транскрипции гена *NFE2L2*. При этом возрастала резистентность к цисплатину, которая, как было обнаружено, подавлялась при действии ингибитора NRF2 брусатола.

Кроме соматических мутаций в генах белков, входящих в АОС NRF2/KEAP1, были обнаружены белки, нарушающие взаимодействие NRF2 с KEAP1, что также приводило к активации ТФ NRF2. Одним из неэлектрофильных активаторов NRF2 является белок p21, ингибитор циклин-зависимой киназы, который связывается с DLG-мотивом NRF2 и нарушает двухсайтовое связывание NRF2 с KEAP1, вызывая накопление NRF2 в ядре клетки и, как следствие, повышает выживаемость раковых клеток при окислительном стрессе [46].

Помимо точечных мутаций был обнаружен новый механизм активации АОС KEAP1/NRF2, реализующийся за счет эпигенетических модификаций, ведущих к подавлению экспрессии гена *KEAP1* в солидных опухолях [37]. Гиперметилирование *KEAP1* дает преимущество в росте раковым клеткам и коррелирует с плохими клиническими прогнозами у онкологических больных с этой аномалией [47].

Эпигенетические модификации в гене *KEAP1* были обнаружены у 51 % пациентов с раком легких на начальной стадии с повышенным риском прогрессирования болезни после хирургического удаления опухоли [37]. Повышенное метилирование промотора гена *KEAP1* было также обнаружено у 51 % пациентов с раком молочной железы в проводимых исследованиях [48]. В группе пациентов с эстроген- и HER2-отрицательным статусом и зарегистрированным метилированием промотора гена *KEAP1* после сеансов химиотерапии был определен наиболее высокий риск рецидивов с величиной относительного риска HR 14,73. Также было показано, что у пациентов с раком почек эпигенетическая модуляция *KEAP1* является одним из ведущих механизмом дерегуляции *KEAP1* (48,6 %) и может рассматриваться как предиктивный маркер выживаемости пациентов [37].

В клетках глиомы повышенное метилирование промотора гена *KEAP1* было обнаружено в 60 % исследованных образцов тканей пациентов [49]. Анализ выживаемости пациентов с глиомой без прогрессирования заболевания после сеансов радиотерапии показал более высокий уровень выживаемости для группы пациентов с метилированным *KEAP1*, чем для группы с неметилированным геном. Отметим, что наблюдение повышенной радиочувствительности глиомы у пациентов с низкой экспрессией *KEAP1*, ведущей к активации АОС NRF2, не согласуются с приведенными выше данными, указывающими на уменьшение радиочувствительности при повышенной экспрессии NRF2 в раковых клетках и образцах тканей. В работе было предположено, что метилирование промотора гена *KEAP1* в клетках глиомы может вызывать повышение чувствительности раковых клеток к лучевой терапии. Отметим, что возрастание чувствительности к химиотерапии было обнаружено у пациентов с раком молочной железы с метилированием промотора гена *KEAP1* [48].

5. Антиоксидантная система NRF2 клетки как мишень таргетной терапии для повышения радиочувствительности раковых клеток

Активация АОС NRF2/KEAP1 раковых клеток при возрастании уровня АФК способ-

ствуется адаптации клеток к окислительному стрессу, вызванному действием ионизирующего излучения и, как следствие, приводит к радиорезистентности раковых клеток. Как было показано выше, активация АОС NRF2/KEAP1 может происходить в результате как *de novo* мутаций в сигнальной системе NRF2/KEAP1 при канцерогенезе, так и как защитный ответ клетки на окислительный стресс, вызванный радиацией. Повышенная активность АОС NRF2/KEAP1, обнаруженная во многих видах раковых клеток, свидетельствует о высокой зависимости некоторых видов рака от функционирования антиоксидантной системы клетки. NRF2-зависимые раковые опухоли с мутациями NRF2, KEAP1 и CUL3 проявляют высокую терапевтическую резистентность и являются маркерами плохого прогноза протекания болезни у пациентов с немелкоклеточным раком легких, раком пищевода и раком головы и шеи [50]. Эта зависимость сильно возрастает при действии лучевой терапии, направленной на генерацию АФК в области опухоли. Антиоксидантный ответ раковых клеток на действие ИИ приводит к нейтрализации АФК, что позволяет раковым клеткам минимизировать поражающее действие радиации. Как было показано в предыдущем разделе, на сегодняшний день накоплен большой экспериментальный и клинический материал по дозозависимой активации АОС NRF2/KEAP1 и возрастанию экспрессии NRF2-контролируемых ферментов АОС при действии радиации, что позволяет рассматривать АОС NRF2/KEAP1 как перспективную мишень таргетной терапии в комбинации с лучевой терапией.

Успешное применение таргетной терапии в клинической онкологии определяется ингибирующим действием лекарственных препаратов на клеточные сигнальные пути, которые аномально активированы в раковых клетках за счет онкомутаций в онкогенах и генах онкосупрессорах. Значительных успехов таргетная терапия достигла в комбинации с другими видами онкотерапии. Учитывая большое количество примеров опухолей, демонстрирующих aberrantную активацию ТФ NRF2, его следует рассматривать как важную фармакологическую мишень для таргетной терапии. Применение таргетной терапии, направленной на подавление активации АОС NRF2/KEAP1, в комбинации с радиотерапией представляется перспективной стратегией по повышению радиочувствительности злокачественных новообра-

зований. Предполагается, что возрастание радиочувствительности при ингибировании АОС в клетках опухоли происходит за счет неуправляемого возрастания уровня АФК в результате генерации АФК при действии ионизирующего излучения в ряде раковых клетках с высоким базальным уровнем АФК. При блокировке ТФ NRF2 дополнительно происходит репрессия NRF2-зависимых генов, контролирующих метаболические и сигнальные системы выживаемости раковых клеток, их пролиферацию, синтез аминокислот (серина и глицина), а также системы поддержания самообновления и плюрипотентности раковых стволовых клеток [5]. Подавление этих клеточных систем дополнительно приводит к повышению радиочувствительности за счет ингибирования роста раковых клеток и усиления дифференциации раковых стволовых клеток.

В настоящее время активно развиваются методы таргетирования различных подсистем в пути АОС NRF2/KEAP1 в качестве мишеней для лекарственной терапии [7, 9, 47, 51, 52]. Большие успехи достигнуты по разработке активаторов АОС NRF2 в качестве цитопротекторных препаратов в терапии различных заболеваний, связанных с развитием окислительного стресса, в том числе онкологических заболеваний [9]. Многие разработанные препараты-активаторы ТФ NRF2 уже одобрены FDA для клинического применения [53]. В отличие от активаторов NRF2, сравнительно мало эффективных ингибиторов NRF2, обладающих высокой специфичностью, разработано на сегодняшний день, и их разработка находится на уровне доклинических и клинических испытаний [54]. Но учитывая большой накопленный материал, указывающий на важную роль повышенной активности ТФ NRF2 и мутаций в АОС NRF2/KEAP1 при канцерогенезе и развитии терапевтической резистентности, ведется разработка эффективных стратегий по блокировке АОС NRF2/KEAP1 на различных уровнях сложной регуляции этой сигнальной системы.

Большая группа ингибиторов ТФ NRF2 представляет собой природные или синтетические соединения. К природным ингибиторам NRF2 относятся выделенные из растений соединения, такие как флавоноиды (апегенин, лютеолин), алкалоиды (галофугинон, тригонеллин, барберин) и квасиноиды (брусатол) и другие природные препараты (триптолидин, генсеносид) [55, 56]. Хотя ни один из препаратов не был одобрен для лечения рака, результаты

клинических испытаний таргетирования ТФ NRF2 показали многообещающие результаты по подавлению роста опухоли и усилению чувствительности к противораковым препаратам за счет хронического возрастания уровня АФК и окислительного стресса в клетках опухоли у пациентов с колоректальной карциномой, раком легких, желудка и с плоскоклеточным раком языка [55].

Как было обнаружено, многие противораковые препараты, применяющиеся в клинике, кроме своего прямого терапевтического действия, оказывают ингибирующее действие на АОС NRF2, делая клетки уязвимыми по отношению к окислительному стрессу [57]. Обнаружение не прямых терапевтических эффектов известных лекарственных препаратов позволяет говорить о дополнительных механизмах действия этих препаратов на раковые клетки за счет ингибирования АОС NRF2. Например, было показано, что ингибированием АОС NRF2 обладают многие химиотерапевтические препараты. Так, применение препаратов темозоломид-1 и гомохаррингтонин (ингибитор элонгации) позволило подавить экспрессию NRF2 на уровне транскрипции и эффективно повысить чувствительность клеток рака легких и мочевого пузыря к препаратам химиотерапии [57].

Подавление активности ТФ NRF2 на различных уровнях сигнальной системы АОС демонстрируют некоторые препараты таргетной терапии. Противораковый препарат энтинонат, который является ингибитором деацетилирования гистонов, ингибирует синтез NRF2 на уровне трансляции за счет ацетилирования и уменьшения активности белка YB-1, который участвует в NRF2 мРНК трансляции [57] и проявляет высокую активность в клетках саркомы. Это дополнительное терапевтическое действие лекарства вызывало окислительный стресс в клетках саркомы *in vitro* и значительно подавило метастазирование саркомы *in vivo*. Также противоопухолевый препарат омипалисиб (двойной ингибитор PI3K/mTOR) ингибирует синтез NRF2 за счет подавления NRF2 мРНК трансляции и оказывает терапевтический эффект при раке желудка, саркоме и остеросаркоме. PI3K-DNAРК ингибитор PIK-75 двойного действия вызывает деградацию NRF2 и способствует преодолению резистентности рака поджелудочной железы по отношению к гемцитобину [54]. Vcl-2 ингибитор венетослак подавляет повышенную экспрессию NRF2, вызванную демитилированием *NFE2L2* гена и приво-

дит к повышенной генерации АФК в митохондриях и апоптозу в клетках при миелоидной лейкемии.

Подавлением активности ТФ NRF2 на эпигенетическом уровне обладают препараты таргетной терапии трастузумаб и пертузумаб – ингибиторы HER2 рецепторов. Их совместное действие вызывает метилирование промотора *NFE2L2* гена, что приводит к ингибированию экспрессии NRF2 на эпигенетическом уровне с последующей генерацией АФК и подавлением синтеза глутатиона [44].

Применение таргетной терапии NRF2 при лучевой терапии требует определения тех типов рака, для которых эта комбинация будет наиболее эффективной. Главным образом это злокачественные опухоли, клетки которых проявляют зависимость от АОС NRF2, что проявляется в повышенной активности ТФ NRF2 и их пониженной радиочувствительности. В первую очередь сюда нужно отнести линии раковых клеток, в которых обнаружены мутации в генах *NFE2L2* (NRF2), *KEAP1* и *CUL3*, а также эпигенетические модификации в генах *NFE2L2* и *KEAP1*, ведущие к активации ТФ NRF2.

6. Заключение

Экспериментальные и клинические исследования показали, что антиоксидантная система NRF2/KEAP1 раковых клеток является одной из потенциальных мишеней для таргетной терапии при проведении лучевой терапии. Это связано с высокой частотой мутаций в АОС раковых клетках и ее важной ролью в приобретенной радиорезистентности. Повышенный антиоксидантный ответ раковых клеток при активации АОС NRF2/KEAP1 усиливает деградацию АФК в раковых клетках и позволяет клеткам адаптироваться к оксидантному стрессу при действии ионизирующего излучения. Адаптивный ответ клетки приводит к ослаблению радиочувствительности раковых клеток. При ингибировании АОС NRF2 происходит подавление антиоксидантной защиты раковых клеток, что вызывает неконтролируемое превышение уровня АФК выше порогового уровня, приводящее к развитию оксидативного стресса и гибели раковых клеток. Разработки терапевтических стратегий по блокировке активации АОС NRF2/KEAP1 при радиотерапии может повысить эффективность персонализированной

лучевой терапии для большого числа онкологических больных.

Для определения эффективности данной комбинированной радиотерапии необходимо проведение дальнейших исследований, подтверждающих связь мутаций и эпигенетических модификаций в АОС NRF2/KEAP1 с радиорезистентностью. Экспериментальные и клинические исследования в этом направлении позволят определить NRF2-зависимый механизм радиорезистентности и в дальнейшем осуществлять выбор соответствующих групп пациентов, для которых будет эффективна персонализированная комбинационная радиотерапия. При этом для выделенных групп пациентов при лучевой терапии могут быть выбраны режимы фракционирования с увеличенной дозой облучения.

Другим важным направлением в развитии комбинированной радиотерапии данного типа является определение критических мишеней для эффективного ингибирования АОС NRF2. Как было показано в обзоре, многие сигнальные белки АОС NRF2, функционирующие в различных ее подсистемах, могут являться терапевтическими мишенями. При этом блокировка АОС NRF2 может быть реализована как путем ингибирования сигнальных белков АОС, так и осуществляться на генетическом или эпигенетическом уровнях. Конкретная мишень для терапевтического воздействия должна выбираться на основе молекулярных и генетических данных о нарушениях в функционировании NRF2 АОС, приводящих к ее повышенной активности в различных типах рака. Это также позволит разработать методы персонализированной радиосенсибилизации опухолей у пациентов с определенными мутациями в АОС NRF2.

Эффективность совместного действия радиотерапии с подавлением антиоксидантной системы NRF2/KEAP1 существенно зависит от активационного статуса АОС и ее ответа на действие ионизирующего излучения в различных видах раковых опухолей. Включение в дальнейшие исследования и клиническую практику протеомных и геномных данных по мутациям и активации АОС NRF2/KEAP1 может использоваться для выбора наилучшего варианта персонализированной комбинационной лучевой терапии и определения групп пациентов с NRF2-зависимым механизмом радиорезистентности.

По указанным направлениям сегодня ведутся интенсивные экспериментальные и клинические исследования, что указывает на несомненные потенциальные возможности для развития комбинационной лучевой терапии с блокировкой антиоксидантной системы NRF2/KEAP1 раковых клеток с целью повышения эффективности персонализированной лучевой терапии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № ФГФЗ-2023-0004).

Список литературы

1. Омельчук ЕП, Кутилин ДС, Димитриади СН, Гусарева МА, Тимошкина НН. Молекулярно-генетические аспекты радиорезистентности рака предстательной железы. Бюллетень сибирской медицины. 2021; 20 (3): 182-92. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-3-182-192>.
2. Olivares-Urbano MA, Grinań-Lisón C, Marchal JA, Núñez MI. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells*. 2020; 9 (7): 1651. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>.
3. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020; 38 (2): 167-97. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.
4. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020; 52 (2): 192-203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>.
5. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*. 2018; 34 (1): 21-43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
6. Oshi M, Gandhi S, Yan L, et al. Abundance of reactive oxygen species (ROS) is associated with tumor aggressiveness, immune response and worse survival in breast cancer. *Breast cancer Research and Treatment*. 2022; 194 (2): 231. <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06633-0>.
7. Glorieux C, Liu S, Trachootham D, Huang P. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. *Nat Rev Drug Discov*. 2024; 23 (8): 583-

606. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00979-4>.
8. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol.* 2020; 40 (13): e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>.
 9. Зенков, НК, Меньщикова ЕБ, Ткачев ВО. Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень. *Биохимия.* 2013; 78 (1): 27-47.
 10. Egorov ES, С ЕЕ, Kondratenko ND, et al. A new mouse strain with mutation in the NFE2L2 (NRF2 gene). *Biokhimiya.* 2023; 88 (12): 2375-86. <https://doi.org/10.31857/S0320972523120035>.
 11. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Frontiers in Oncology.* 2017;7. Accessed February 12, 2024. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2017.00085>.
 12. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of NRF2 in cancer. *Pharmacological Research.* 2008; 58 (5-6): 262-70. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.09.003>.
 13. Kobayashi H, Imanaka S, Shigetomi H. Revisiting therapeutic strategies for ovarian cancer by focusing on redox homeostasis. *Oncology Letters.* 2022; 23: 80. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13200>.
 14. Tufekci KU, Civi Bayin E, Genc S, Genc K. The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2011; 2011: 314082. <https://doi.org/10.4061/2011/314082>.
 15. Mirzaei S, Zarrabi A, Hashemi F, et al. Nrf2 Signaling Pathway in Chemoprotection and Doxorubicin Resistance: Potential Application in Drug Discovery. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10 (3): 349. <https://doi.org/10.3390/antiox10030349>.
 16. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Boczkowski J, Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Molecular Medicine.* 2011; 17 (7): 363-71. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.02.006>.
 17. Dinkova-Kostova AT, Copples IM. Advances and challenges in therapeutic targeting of NRF2. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2023; 44 (3): 137-49. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.12.003>.
 18. Li Y, Zhang X, Wang Z, Li B, Zhu H. Modulation of redox homeostasis: A strategy to overcome cancer drug resistance. *Front Pharmacol.* 2023; 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1156538>.
 19. Корман ДБ, Островская Л. А., Кузьмин В.А. Индукция оксидативного стресса в опухолевых клетках - новый подход к лекарственному лечению злокачественных опухолей. *Биофизика.* 2019; 64 (3): 552-62. <https://doi.org/10.1134/S0006302919030165>.
 20. Marampon F, Codenotti S, Megiorni F, et al. NRF2 orchestrates the redox regulation induced by radiation therapy, sustaining embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cells radioresistance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019; 145 (4): 881-93. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02851-0>.
 21. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.* 2015; 88 (Pt B): 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>.
 22. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochem Sci.* 2014; 39 (4): 199-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
 23. Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 244 (1): 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.018>.
 24. Liu S, Pi J, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox Biol.* 2022; 54: 102389. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102389>.
 25. Khalil HS, Goltsov A, Langdon SP, Harrison DJ, Bown J, Deeni Y. Quantitative analysis of NRF2 pathway reveals key elements of the regulatory circuits underlying antioxidant response and proliferation of ovarian cancer cells. *J Biotechnol.* 2015; 202: 12-30. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2014.09.027>.
 26. Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, Bunz F, Biswal S. Gain of NRF2 Function in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Confers Radioresistance. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 13 (11): 1627-37. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3219>.
 27. Matsuoka Y, Yoshida R, Kawahara K, et al. The antioxidative stress regulator NRF2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modula-

- tion. *Lab Investig.* 2022;102 (8): 896-907. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00776-w>.
28. Xia D, Zhang XR, Ma YL, Zhao ZJ, Zhao R, Wang YY. NRF2 promotes esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) resistance to radiotherapy through the CaMKII -associated activation of autophagy. *Cell & Biosci.* 2020; 10 (1): 90. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00456-6>.
29. Kawasaki Y, Okumura H, Uchikado Y, et al. Nrf2 is Useful for Predicting the Effect of Chemoradiation Therapy on Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21 (7): 2347-52. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3600-2>.
30. Tang T, Jia Y, Liang H, et al. Knockdown of Nrf2 radiosensitizes glioma cells by inducing redox stress and apoptosis in hypoxia. *Transl Cancer Res.* 2022; 11 (11): 4105-16. <https://doi.org/10.21037/tcr-22-1420>.
31. Столбовой АВ, Залялов ИФ. Радиобиологические модели и клиническая радиационная онкология. *Онкология. Журнал им П.А. Герцена.* 2016; 5 (6): 88. <https://doi.org/10.17116/onkolog20165688-96>.
32. Ваннус М, Шемель ВД, Гольшев ГГ, Гольцов АН. Метод определения радиорезистентности линий раковых клеток на основе кластерного анализа данных клоногенной выживаемости клеток. *Медицинская физика.* 2024; (1): 18-35.
33. Feng L, Zhao K, Sun L, et al. SLC7A11 regulated by NRF2 modulates esophageal squamous cell carcinoma radiosensitivity by inhibiting ferroptosis. *J Translat Med.* 2021; 19 (1): 367. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03042-7>.
34. McDonald JT, Kim K, Norris AJ, et al. Ionizing radiation activates the NRF2 antioxidant response. *Cancer Res.* 2010; 70 (21): 8886-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0171>.
35. Jayakumar S, Kunwar A, Sandur SK, Pandey BN, Chaubey RC. Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: role of reactive oxygen species, GSH and NRF2 in radiosensitivity. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840 (1): 485-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.006>.
36. Jeong Y, Hoang NT, Lovejoy A, et al. Role of KEAP1/NRF2 and TP53 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma Development and Radiation Resistance. *Cancer Discov.* 2017; 7 (1): 86-101. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0127>
37. Fabrizio FP, Sparaneo A, Trombetta D, Muscarella LA. Epigenetic versus Genetic Deregulation of the KEAP1/NRF2 Axis in Solid Tumors: Focus on Methylation and Noncoding RNAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 2492063. <https://doi.org/10.1155/2018/2492063>.
38. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLOS Med.* 2006; 3 (10): e420. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420>.
39. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Fountzilias E, et al. Keap1 Mutations and Nrf2 Pathway Activation in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2011; 71 (15): 5081-9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4668>.
40. Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, et al. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9 (2): 336. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0589>.
41. Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. *Histopathology.* 2012; 60 (6): 943-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04178.x>.
42. Ooi A, Dykema K, Ansari A, et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2013; 73 (7): 2044-51. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3227>.
43. Jiang T, Chen N, Zhao F, et al. High Levels of Nrf2 Determine Chemoresistance in Type II Endometrial Cancer. *Cancer Res.* 2010; 70 (13): 5486-96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0713>.
44. Khalil HS, Langdon SP, Goltsov A, et al. A novel mechanism of action of HER2 targeted immunotherapy is explained by inhibition of NRF2 function in ovarian cancer cells. *Oncotarget.* Published online October 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12425>.
45. Tao S, Wang S, Moghaddam SJ, et al. Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2. *Cancer Res.* 2014; 74 (24): 7430-41. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1439>.
46. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mec-*

- hanisms. 2011; 16 (2): 123-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>.
47. Copples IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway—a promising therapeutic target? *Adv Pharm (San Diego, Calif)*. 2012; 63: 43-79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398339-8.00002-1>.
48. Barbano R, Muscarella LA, Pasculli B, et al. Aberrant Keap1 methylation in breast cancer and association with clinicopathological features. *Epigenetics*. 2013; 8 (1): 105-12. <https://doi.org/10.4161/epi.23319>.
49. Muscarella LA, Barbano R, D'Angelo V, et al. Regulation of KEAP1 expression by promoter methylation in malignant gliomas and association with patient's outcome. *Epigenetics*. 2011; 6 (3): 317-25. <https://doi.org/10.4161/epi.6.3.14408>.
50. Kitamura H, Motohashi H. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Sci*. 2018; 109 (4): 900-11. <https://doi.org/10.1111/cas.13537>.
51. Zhou S, Ye W, Shao Q, Zhang M, Liang J. Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2013; 88 (3): 706-15. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.09.001>.
52. Paramasivan P, Kankia IH, Langdon SP, Deeni YY. Emerging role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the mechanism of action and resistance to anticancer therapies. *Cancer Drug Resistance*. 2019; 2 (3): 490-515. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.57>.
53. Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, You QD. The Keap1-NRF2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev*. 2016; 36 (5): 924-63. <https://doi.org/10.1002/med.21396>.
54. Telkoparan-Akillilar P, Panieri E, Cevik D, Suzen S, Saso L. Therapeutic Targeting of the NRF2 Signaling Pathway in Cancer. *Molecules*. 2021; 26 (5): 1417. <https://doi.org/10.3390/molecules26051417>.
55. Pouremamali F, Pouremamali A, Dadashpour M, Soozangar N, Jeddi F. An update of NRF2 activators and inhibitors in cancer prevention/promotion. *Cell Communication and Signaling*. 2022; 20 (1): 100. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00906-3>.
56. Zhang J, Xu HX, Zhu JQ, Dou YX, Xian YF, Lin ZX. Natural NRF2 Inhibitors: A Review of Their Potential for Cancer Treatment. *Int J Biol Sci*. 2023; 19 (10): 3029-41. <https://doi.org/10.7150/ijbs.82401>.
57. El-Naggar AM, Somasekharan SP, Wang Y, et al. Class I HDAC inhibitors enhance YB-1 acetylation and oxidative stress to block sarcoma metastasis. *EMBO Rep*. 2019; 20 (12): e48375. <https://doi.org/10.15252/embr.201948375>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № ФГФЗ-2023-0004).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов. **Поступила:** 20.01.2025. **Принята к публикации:** 10.03.2025.

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

Financing. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Grant № ФГФЗ-2023-0004).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.01.2025. **Accepted for publication:** 10.03.2025.