

УДК 57.021, 576.08

ОМЕГА-3 ДОКОЗАГЕКСАЕНОВАЯ КИСЛОТА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНДУКТОР ФЕРРОПТОЗА: ДИНАМИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

© 2025 г. Д. М. Ольховик, М. О. Силкина, А. В. Разумовская, К. В. Клычева,
А. А. Фаткулин, Т. А. Кулагин, С. В. Никулин*

Представлено академиком РАН В.Г. Дебабовым

Поступило 25.09.2024 г.

После доработки 25.10.2024 г.

Принято к публикации 25.10.2024 г.

Ферроптоз — железозависимая форма программируемой клеточной гибели (ПКГ), связанная с перекисным окислением мембранных липидов. Он привлекает внимание в исследованиях рака, так как некоторые опухолевые клетки, устойчивые к другим формам ПКГ, чувствительны к ферроптозу. Несмотря на значительное количество исследований, список известных индукторов ферроптоза остается ограниченным, что создает возможности для поиска новых соединений с клиническим потенциалом. Недавние исследования показали, что длинные полиненасыщенные жирные кислоты, такие как омега-3 докозагексаеновая кислота (ДГК), могут быть индукторами ферроптоза. В данной работе была изучена кинетика ферроптоза в клетках рака предстательной железы и колоректального рака под воздействием эрастина и ДГК. Были обнаружены различия в кинетике и механизмах их действия. Более того, клетки, устойчивые к эрастину, оказались чувствительными к ДГК, что подтверждает перспективность ее дальнейшего изучения как противоопухолевого средства.

Ключевые слова: ферроптоз, рак предстательной железы, колоректальный рак, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты

DOI: 10.31857/S2686738925010147, EDN: tcicrw

ВВЕДЕНИЕ

Ферроптоз является относительно новой формой клеточной смерти, отличающейся от апоптоза и других типов программируемой клеточной гибели (ПКГ) [1]. Он инициируется накоплением железа и избыточным окислением липидов, что приводит к разрушению клеточных мембран [1]. В контексте исследований рака ферроптоз в последнее время вызывает все больший интерес. Так, сообщается, что лекарственно-устойчивые опухолевые клетки чувствительны к ферроптозу, что делает его перспективной альтернативой для запуска гибели опухолевых клеток [2]. Это наблюдение может объясняться данными, которые свидетельствуют о повышенной потребности в железе у опухолевых клеток по сравнению с нормальными [3]. Таким образом,

исследование ферроптоза в контексте рака является весьма перспективным направлением, которое только недавно стало активно развиваться.

В настоящее время уже имеется достаточно большое количество работ, в которых изучается чувствительность опухолевых клеток к индукции ферроптоза [4, 5], однако практически отсутствуют работы, которые определяют и сравнивают кинетику ферроптотической гибели между разными типами опухолевых клеток и разными индукторами ферроптоза. Помимо этого, несмотря на то что список потенциальных индукторов ферроптоза постоянно пополняется, он все еще остается достаточно ограниченным [6], тем самым предоставляя широкое поле для поиска новых соединений, способных вызывать данный тип клеточной гибели. Например, в последнее время появляются данные о том, что такими соединениями могут быть, в частности, полиненасыщенные жирные кислоты [7].

В данной работе была изучена чувствительность двух клеточных линий рака предстательной железы

Национальный исследовательский университет
“Высшая школа экономики”, Москва, Россия

*e-mail: snikulin@hse.ru

и двух линий колоректального рака к классическому индуктору ферроптоза эрастину и к омега-3 докозагексаеновой кислоте (ДГК), так как ранее было показано, что она наиболее эффективно, по сравнению с другими полиненасыщенными жирными кислотами, индуцирует гибель опухолевых клеток [7]. Было проведено сравнение кинетики индуцируемой гибели клеток и выявлены отличия при использовании рассматриваемых индукторов ферроптоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии рака предстательной железы (PC-3, Du145) и колоректального рака (Caco-2, HT-29) культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с 10% FBS (Cargilorn, Германия), 1% Glutamax (Gibco, США) и 1% Anti-anti (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂ в клеточном инкубаторе (Alphavita, Китай). Культуры клеток субкультивировали при помощи раствора трипсина-ЭДТА 0.25% (ПанЭко, Россия) каждые 2-3 дня. Динамику роста клеток оценивали визуально при помощи инвертированного микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, США).

Для анализа кинетики ферроптотической гибели, клетки рассаживали в 96-луночный планшет по 5000 клеток в лунку и инкубировали в 100 мкл культуральной среды в клеточном инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в течение 24 часов. Затем культуральную среду заменяли на контрольную среду или среду, содержащую 10 мкМ эрастин [8], 200 мкМ ДГК [7] или 0.5 мкМ ферростатин-1, а также их комбинации. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 часов. Для визуализации клеточной гибели в добавляемой среде также содержался пропидий йодид (PI) в концентрации 1 мкг/мл. Красный флуоресцентный сигнал мог быть обнаружен только после разрушения клеточной мембраны, поэтому кинетику гибели клеток определяли путем подсчета количества красных флуоресцентных объектов (мертвых клеток) с течением времени при помощи системы анализа живых клеток IncuCyte® S3 (Sartorius, США). Эксперимент проводили в трех повторах. Для оценки статистической достоверности наблюдаемых отличий использовали дисперсионный анализ (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе удалось успешно определить кинетику ферроптотической гибели в двух линиях рака предстательной железы и двух линиях колоректального рака (рис. 1). Микрофотографии мертвых клеток, визуализированных с помощью PI, представлены на рис. 1а, б. Было обнаружено,

что исследуемые клеточные линии предстательной железы (Du145, PC-3 на рис. 1в) оказались более чувствительны к ферроптозу, индуцированному эрастином, по сравнению с линиями колоректального рака (Caco-2, HT-29 на рис. 1г). Линия Du145 оказалась самой чувствительной к ферроптотической гибели, демонстрируя наиболее раннюю смерть (спустя примерно 8 часов после обработки). Другая линия предстательной железы, PC-3, также оказалась восприимчивой к ферроптозу, но с более поздним началом гибели (около 14 часов после обработки эрастином). Значительно меньшую чувствительность продемонстрировали клеточные линии колоректального рака. Если клетки Caco-2 все же начинали погибать спустя примерно 26 часов после обработки, то клетки линии HT-29 не продемонстрировали значительного увеличения количества мертвых клеток по сравнению с контролем на протяжении 48 часов.

Интересно, что все исследуемые линии показали чувствительность к обработке ДГК, при этом классический ингибитор ферроптоза, ферростатин-1, позволил снизить уровень погибших от воздействия ДГК клеток также во всех линиях (рис. 1д, е). Что касается линий рака предстательной железы (рис. 1д), клетки Du145 снова продемонстрировали наибольшую чувствительность. При этом время начала гибели составило около 10–12 часов после обработки ДГК, что несколько позже, чем после соответствующей обработки эрастином. Клеточная линия PC-3, как и в случае обработки эрастином, продемонстрировала меньшую чувствительность, однако в этот раз гибель началась ощутимо позже – примерно через 26 часов после начала эксперимента. Интересным наблюдением стало то, что линия колоректального рака, HT-29, оказавшаяся самой резистентной к действию эрастина, продемонстрировала высокую чувствительность к ДГК: гибель клеток началась уже через 12–14 часов после обработки, при этом ферростатин-1 смог полностью защитить клетки этой линии от гибели (рис. 1е). Влияние же ДГК на линию Caco-2 было схоже с поведением линии PC-3 (рис. 1д, е).

Таким образом, в данной работе было продемонстрировано, что разная чувствительность опухолевых клеточных линий к ферроптозу может выражаться не только в отличиях жизнеспособности, но и в различном времени начала ферроптотической гибели в клетках. В частности, ранее уже было показано, что клеточные линии рака предстательной железы PC-3 и Du145 чувствительны к эрастину [5], однако впервые было продемонстрировано, что при обработке эрастином гибель клеток линии PC-3 начинается значительно позже (примерно на 6 часов), чем в случае клеток Du145. Следовательно, изучение процесса гибели в динамике может позволить

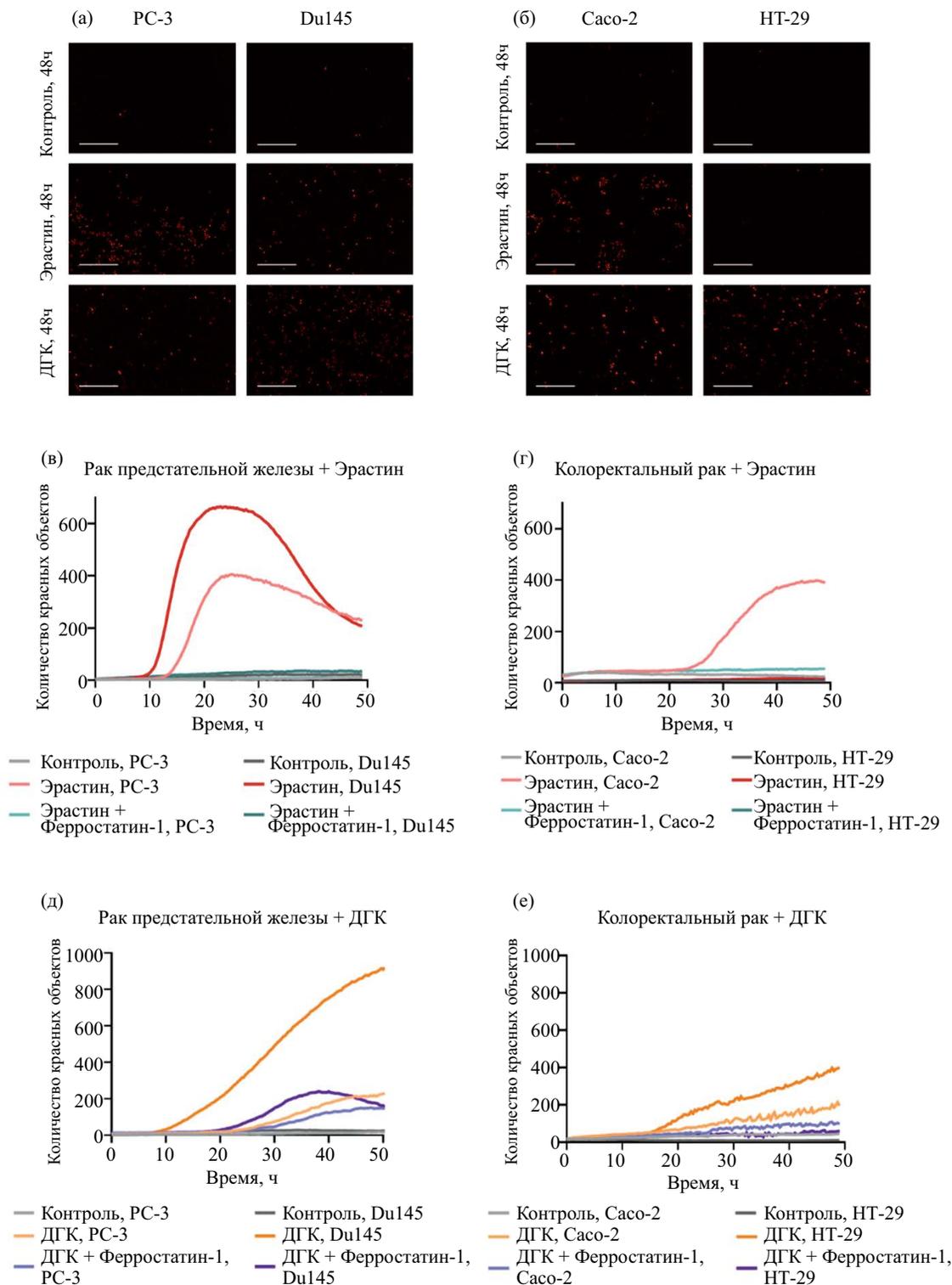


Рис. 1. Прижизненные микрофотографии культур клеток рака предстательной железы (1а) и колоректального рака (1б) спустя двое суток после обработки эрастином и ДГК; результаты оценки жизнеспособности с использованием анализа IncuCyte после обработки эрастином (10 мкМ) и комбинацией эрастина с ферростатином-1 (0.5 мкМ) для клеток рака предстательной железы (1в) и колоректального рака (1г); результаты оценки жизнеспособности с помощью анализа IncuCyte при обработке ДГК (200 мкМ) и комбинацией ДГК с ферростатином-1 (0.5 мкМ) для клеток рака предстательной железы (1д) и колоректального рака (1е).

точнее определить чувствительность, чем измерения в одной временной точке.

Исследования кинетики гибели клеток под воздействием различных индукторов ферроптоза также могут помочь выявить отличия в механизмах их действия. Ранее уже было показано, что полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), включая докозагексаеновую кислоту, могут индуцировать ферроптоз в опухолевых клетках [7,9]. Однако в других исследованиях было продемонстрировано, что помимо ферроптоза, ПНЖК и, в частности, ДГК, могут индуцировать и апоптотический путь гибели клеток [10,11], и, таким образом, механизм их действия может быть смешанным. В нашей работе мы сравнили чувствительность клеток к обработке эрастином и ДГК, и нашли ряд заметных отличий. Во-первых, скорость гибели клеток под воздействием ДГК была значительно ниже, чем под воздействием эрастина, несмотря на то что время начала гибели могло быть сопоставимым. Во-вторых, классический ингибитор ферроптоза, ферростатин-1, полностью предотвращал клеточную гибель, индуцированную ДГК, только в случае клеток колоректального рака HT-29. Во всех других случаях он значительно снижал количество мертвых клеток, но не мог полностью остановить индукцию клеточной гибели. Эти данные свидетельствуют о том, что механизм действия ДГК значительно отличается от эрастина, и что ДГК потенциально может индуцировать клеточную смерть не только по механизму ферроптоза. Более того, в данной работе было показано, что устойчивые к эрастину клетки могут быть чувствительны к ДГК, что подтверждает перспективность дальнейшего изучения применения этой омега-3 ПНЖК в качестве противоопухолевого агента.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках исследования (№ 24-00-027 «Изучение влияния омега-3 и омега-6 жирных кислот на опухолевые клетки») при поддержке программы «Научный фонд Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики» (НИУ ВШЭ)».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-apoptotic Cell Death // *Cell*. 2012. Vol. 149, N5. P. 1060–1072.
2. *Ozkan E. and Bakar-Ates F.* Ferroptosis: A Trusted Ally in Combating Drug Resistance in Cancer // *Current Medicinal Chemistry*. 2022. Vol. 29, N1. P. 41–55.
3. *Hassannia B., Vandenabeele P., and Vanden Berghe T.* Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer // *Cancer Cell*. 2019. Vol. 35, N6. P. 830–849.
4. *Qian H., Wanhu W., Daiqian W., et al.* Blockade of GCH1/BH4 Axis Activates Ferritinophagy to Mitigate the Resistance of Colorectal Cancer to Erastin-Induced Ferroptosis // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022. Vol. 6, N4. P. 229–239.
5. *Yang Y., Liu T., Hu C., et al.* Ferroptosis inducer erastin downregulates androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer // *Oncology Reports*. 2021. Vol. 45, N4.
6. *Su Y., Zhao B., Zhou L., et al.* Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs // *Cancer Letters*. 2020. Vol. 483. P. 127–136.
7. *Nikulin S., Razumovskaya A., Poloznikov A., et al.* ELOVL5 and IGFBP6 genes modulate sensitivity of breast cancer cells to ferroptosis // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2023. Vol. 10, P. 1–17.
8. *Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Simonyan R.A., et al.* Mitochondrial lipid peroxidation is responsible for ferroptosis // *Cells*. 2023. Vol. 12, N4. P. 611.
9. *Yang W.S., Kim K.J., Gaschler M.M., et al.* Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. Vol. 113, N34. P. 4966–4975.
10. *Das M. and Das S.* Identification of cytotoxic mediators and their putative role in the signaling pathways during docosahexaenoic acid (DHA)-induced apoptosis of cancer cells // *Apoptosis*. 2016. Vol. 21, N12. P. 1408–1421.
11. *Chen Z.Y. and Istfan N.W.* Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2000. Vol. 63, N5. P. 301–308.

OMEGA-3 DOCOSAHEXAENOIC ACID AS A PROMISING INDUCER OF FERROPTOSIS: DYNAMICS OF ACTION IN PROSTATE AND COLORECTAL CANCER MODELS

D. M. Olkhovik, M. O. Silkina, A. V. Razumovskaya, K. V. Klycheva,
A. A. Fatkulin, T. A. Kulagin, S. V. Nikulin*

Presented by Academician of the RAS V.G. Debabov

HSE University, Moscow, Russian Federation

**e-mail: snikulin@hse.ru*

Ferroptosis is an iron-dependent form of programmed cell death (PCD) associated with lipid membrane peroxidation. It has gained attention in cancer research because some tumor cells that are resistant to other forms of PCD are sensitive to ferroptosis. Despite the significant amount of research on ferroptosis, the list of known inducers remains limited, creating opportunities to discover new compounds with clinical potential. Recent studies have shown that long-chain polyunsaturated fatty acids, such as omega-3 docosahexaenoic acid (DHA), can act as ferroptosis inducers. This study examined the kinetics of ferroptosis in prostate and colorectal cancer cells under the influence of erastin and DHA. Differences in the kinetics and mechanisms of action were observed. Moreover, cells resistant to erastin were found to be sensitive to DHA, confirming the potential of further research into its use as an anti-cancer agent.

Keywords: ferroptosis, prostate cancer, colorectal cancer, omega-3 polyunsaturated fatty acids