

МЕТАБОЛИЗМ ЖЕЛЕЗА И ФЕРРОПТОЗ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

В.А. Чубенко

IRON METABOLISM AND FERROPTOSIS AS A THERAPEUTIC TARGET

В.А. Чубенко

Кандидат медицинских наук, заведующий отделением химиотерапии
солидных опухолей ГБУЗ «Спб КНпЦСВМП(о)»,
197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.

V.A. Chubenko

Candidate of Medicine, head of chemotherapy department Saint-Petersburg Research and
Clinical Center of specialized types of medical care (oncological),
197758, Saint-Petersburg, Pesochny-2, Leningradskaya str., 68a Lit A.

Клеточные потери являются важнейшей характеристикой любой ткани, в т.ч. и опухолевой. Они являются регулятором пролиферации и метастазирования, а также определяют развитие лекарственной резистентности. Поэтому понимание механизмов и поиск мишеней альтернативной клеточной гибели может быть перспективной терапевтической стратегией с целью длительного контроля опухолевого роста. В данной работе описаны механизмы ферроптоза, железоопосредованной неапоптотической клеточной гибели вследствие перекисного окисления липидов. В этой связи для клинициста, помимо появления новых опций лекарственной терапии, которые могут воздействовать на ключевые аспекты данного процесса, важен и поиск предиктивных маркеров подобной метаболической терапии диссеминированных опухолей.

Ключевые слова: ферроптоз, метаболизм железа, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

The cell death is the most important characteristic of any tissue, including malignant tumors. It controls the proliferation and metastasis. Besides cell death determines the development of the drug resistance. In this context, the understanding of the mechanisms and searching for the targets of the alternative cellular loss can be a promising therapeutic strategy for long-term control of the tumor growth. This paper describes the mechanisms of ferroptosis, an iron-mediated non-apoptotic cell death due to lipid peroxidation. In this regard, in addition to the emergence of new therapeutic options that can affect key aspects of this process, the search for predictive markers of such metabolic therapy is also important for the clinicians.

Key words: ferroptosis, iron metabolism, lipid peroxidation, antioxidant.

Одними из характеристик ткани, в т.ч. и опухолевой, являются пролиферация и гибель клетки. При этом клеточные потери, как ни парадоксально бы это ни звучало, с одной стороны, являются стимулом для роста злокачественных новообразований в виде источника энергетических метаболитов [1]. С другой стороны, это один из механизмов резистентности к стандартной проводимой терапии [2]. На сегодняшний день мы видим в клинической практике, что вылечить метастатический опухолевый процесс достаточно сложно, несмотря на применение хирургических и лучевых

методов, а также лекарственного лечения вплоть до высокодозной химиотерапии с трансплантацией стволовых клеток [3]. В этой связи, учитывая патогенетическую резистентность опухолевых клеток к апоптозу [1], понимание механизмов и поиск мишеней альтернативной клеточной гибели может быть перспективной терапевтической стратегией с целью длительного контроля опухолевого роста.

Целью любого лечения является избирательная эрадикация опухолевых клеток. При этом клеточная гибель не является каким-то единовременным или однократным событием, а представляет собой длительный процесс, включающий различные этапы, на фоне, например, естественного старения, терапии или вследствие биологических особенностей различных видов опухолевых клеток. Интересно отметить, что механизм смерти может быть как случайным, так и «запрограммированным» [1]. Отличием является активация специальных сигнальных каскадов. На сегодняшний день выделяют 6 механизмов клеточной гибели: 1) апоптоз; 2) пироптоз; 3) некроз; 4) аутофагия; 5) окситоз; 6) ферроптоз [1].

Что такое ферроптоз? Это железозависимый неапоптотический механизм гибели, вызванный чрезмерным и неограниченным перекисным окислением липидов с последующим разрушением всех мембран злокачественной клетки [4]. Впервые подобный термин предложил в 2012 г. Scott Dixon [4]. Его работа была связана с изучением терапевтических препаратов, которые должны селективно блокировать пролиферацию клеток с мутацией в гене RAS. В 2003 г. был синтезирован эрастин, который вызывал гибель HRAS-мутированных фибробластов. При этом исследователи отметили, что разрушение клеток не имело характерных признаков апоптоза, таких как: 1) активация ферментов каспаз, 2) экспрессия маркера аннексина V, 3) морфологические изменения в ядре [2]. Дальнейшие исследования к 2007 г. установили, что эрастин способствует образованию свободных радикалов, которые вызывают гибель клетки, но эффект их может быть подавлен применением токоферола (витамина E). Параллельно в 2008 г. был синтезирован препарат RSL3 (Ras selective lethal 3), который, подобно эрастину, вызывал неапоптотическую гибель клетки в RAS-мутированных опухолях: ее блокада достигалась применением витамина E или деферроксамина (препарат, связывающий ионы железа). В итоге в 2012 г. была опубликована экспериментальная работа, в которой демонстрировались морфологические, биохимические, метаболические и генетические признаки ферроптоза как механизма клеточной гибели на фоне его индукторов – эрастина и RLS3 [4]. Надо отметить, что применение в этих экспериментах активаторов апоптоза, некроза или аутофагии не приводило к разрушению опухоли [5]. На сегодняшний день, помимо злокачественных опухолей, ферроптоз изучается при многих патологиче-

ских состояниях: это нейродегенеративные (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера), сердечно-сосудистые и гинекологические заболевания, а также острые повреждения органов (травма печени, почек, спинного мозга) [3].

Ключевые элементы ферроптоза

Основными субстратами для индукции ферроптоза являются:

1. Свободное железо внутри клетки (Fe^{2+})
2. Перекисное окисление липидов
3. Нарушение системы антиоксидантной защиты

Метаболизм железа

По сравнению с нормальными клетками железо является необходимым элементом для опухолевой прогрессии [6]. В эпидемиологических исследованиях было показано, что высокое содержание данного микроэлемента в пище способствует риску развития гепатоцеллюлярного рака и рака молочной железы [7]. В экспериментальных исследованиях было показано, что железо способствует образованию рака поджелудочной железы у мышей [6].

Впервые роль ионов железа в регуляции клеточной гибели была продемонстрирована в 1996 г. [8]. Авторы показали, что препараты, связывающие железо (хелаторы железа), препятствуют гибели клетки в случае депривации цистина.

Биологическая функция железа заключается в том, что оно является катализатором многих биохимических реакций, необходимых для жизнедеятельности клетки, поскольку входит в состав основных ферментов. Оно может находиться в свободном (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{4+}) и связанном (в виде гема или в составе ферритина) состояниях, а также в виде железо-сульфидных кластеров в митохондриях [9].

Избыток свободного железа в опухолевых клетках является триггером ферроптоза. Высокая концентрация достигается за счет: 1) повышения транспорта в клетку; 2) снижения «запасов» связанной с белками формы; 3) ограничения выхода железа из клетки.

Свободная форма Fe^{3+} находится в межклеточном пространстве. Транспорт железа в клетку осуществляется через трансферриновый рецептор (TFR) за счет белков переносчиков (серотрансферрин и лактоферрин) в эндосомах. Внутри клетки за счет ферментов (STEAP) в транспортном пузырьке Fe^{3+} превращается в Fe^{2+} , которое через специальный канал SLC11A2 высвобождается в цитоплазму. Далее железо распределяется по следующим направлениям: 1) ферроптоз, 2) встраиваются в железосодержащие белки митохондрий и участвуют в синтезе различных кофакторов, 3) запасаются в виде ферритина, 4) выходят из клетки [1].

Деградация ферритина в клетке посредством механизма аутофагии способствует накоплению свободного железа в клетке. Нарушение функции не-

которых белков переносчиков митохондрий снижает концентрацию сульфата железа и ограничивает выход данного микроэлемента из клетки [10, 11].

Таким образом, экспрессия белков практически любого этапа метаболизма железа в клетке может быть как предиктивным маркером ферроптоза, так и потенциальной терапевтической мишенью.

Почему высокое содержание железа в клетке приводит к перекисному окислению липидов и образованию свободных радикалов? Одним из механизмов этого является активация железозависимой реакции Фентона (предполагающей механическое взаимодействие жирных кислот и Fe^{2+}). С другой стороны, происходит повышение функциональной активности железосодержащих белков, таких как липоксигеназы (конкурентно с антиоксидантной защитой) [12].

Перекисное окисление липидов

Какие жирные кислоты подвержены перекисному окислению? На основании проведенных липидомных исследований можно утверждать, что чаще всего процесс окисления затрагивает основной компонент клеточных мембран – это полиненасыщенные жирные кислоты (пнЖК), арахидоновая и аденоловая [13]. Безусловно, одних пнЖК недостаточно. Образование клеточных мембран представляет собой сложный многоступенчатый процесс, включающий различные ферменты синтеза и сигнальные каскады. В этой связи основными ключевыми факторами являются [1-3, 14]: 1) ацетил-кофермент А (необходим для синтеза пнЖК и глутатиона); 2) аденозин монофосфат киназа (АМРК) (с одной стороны, подавляет активность глутатиона за счет фосфорилирования беклин 1; с другой стороны, ограничивает синтез пнЖК); 3) пероксисомы (являются донором пнЖК); 4) различные липоксигеназы (приводят к образованию эффекторных свободных радикалов); 5) активность митохондрий; 6) аутофагия (является донором пнЖК); 7) бета-окисление жирных кислот в митохондриях (является альтернативным источником энергии в клетке и снижает активность ферроптоза).

Безусловно, изучение экспрессии регуляторов перекисного окисления липидов в различных опухолевых клетках будет являться перспективным направлением в поиске предиктивного маркера активации ферроптоза и терапевтического воздействия.

Нарушение системы антиоксидантной защиты

На сегодняшний день ключевыми системами антиоксидантной защиты, участвующими в регуляции ферроптоза, являются:

1) Система глутатиона. Ключевым ферментом данного пути является глутатион пероксидаза 4 (GPX4). Он приводит к прямому разрушению свободных радикалов, которые образовались вследствие окисления липидов [15]. Основным субстратом его активности является глутатион. При этом интересно отметить, что

высокая экспрессия GPX4 является фактором плохого прогноза, например, при раке молочной железы [16]. Активность фермента зависит от концентрации глутатиона и селена в опухолевой клетке [17]. Синтез глутатиона осуществляется за счет трех аминокислот (цистеин, глицин и глутаминовая кислота). Цистеин является основным лимитирующим фактором [18]. Для того, чтобы цистеин образовался в опухолевой клетке, существует система хс. Это группа белков-переносчиков, которые осуществляют поступление цистина (предшественника цистеина) из межклеточной жидкости в цитоплазму в обмен на глутамат. В 1955 г. была опубликована первая работа, в которой описывалось значение цистеина в регуляции роста клеток саркомы матки [19]. Оказалось, что депривация этой аминокислоты приводит к торможению роста опухоли, а добавление глутатиона нивелировало подобный эффект. Кроме того, анализ 177 опухолевых клеточных линий выявил, что наиболее уязвимыми, с точки зрения активности GPX4, являются почечно-клеточный рак и диффузная b-клеточная крупноклеточная лимфома [20].

2) Кофермент Q10 (является альтернативной антиоксидантной защитой, связанной с внутренней мембраной митохондрий, которая нейтрализует образованные свободные радикалы [21].

Таким образом, активность системы антиоксидантной защиты в опухолевой клетке является как предиктивным фактором ферроптотической регуляции клеточной гибели, так и потенциальной терапевтической мишенью.

Помимо описанных ключевых элементов ферроптоза, в этот процесс, безусловно, включены и альтернативные регуляторные молекулы. К ним относятся [6, 22-24]:

1) Проонкогены.

а. Мутация в гене RAS приводит к следующим особенностям: эрастин селективно стимулирует ферроптоз; высокое число свободного железа внутри клетки в связи с активностью генов метаболизма Fe (TFRC, FTH1, FTL); значительная концентрация свободных радикалов; глутамин является основным источником энергии и определяет активность GPX4; высокая активность аутофагии.

б. Мутация в гене EGFR приводит к стимуляции ферроптоза.

с. Ген p53 подавляет функцию системы хс

2) Гены метаболизма. NFE2L2 – ингибитор ферроптоза за счет активации генов, которые связывают железо; кроме того, подобный регулятор активирует глутатион и снижает концентрацию свободных радикалов.

3) PI3CA-mTOR сигнальный каскад – стимулирует образование мононенасыщенных ЖК, предотвращая ферроптоз.

4) Микроокружение. CD8⁺ клетки в опухолевом микроокружении выделяют ИФН-гамма, который по-

давляет активность системы хс⁻. Лактат в опухолевом микроокружении стимулирует образование мононе-насыщенных ЖК, предотвращая ферроптоз.

5) Аутофагия. Является донором фосфолипидов для перекисного окисления, обеспечивает высокую концентрацию свободного Fe²⁺ внутри клетки.

6) Глюкоза является источником ацетил кофермента А для синтеза липидов.

7) Функция митохондрий. Приводит к депривации цистеина и стимулирует ферроптоз, является основным источником свободных радикалов и утилизации железа, является источником продуктов для образования липидов (альфа-кетоглутарат).

Основными эффекторными молекулами ферроптоза, то есть теми, которые вызывают непосредственно разрушение клетки, являются, скорее всего, свободные радикалы (гидропероксиды жирных кислот) [23].

К морфологическим изменениям на фоне ферроптоза относятся: 1) разрушение клеточных мембран, 2) уменьшение митохондрий; 3) утолщение внутренней мембраны митохондрий; 4) разрушение митохондриальных крист; 5) нормальная структура ядра клетки [18].

Таким образом, исходя из описанных механизмов клеточной гибели, очевидно, что перспективной стратегией является активация ферроптоза в опухолевой клетке за счет воздействия на его ключевые этапы. Принципиально описано несколько путей активации ферроптоза:

1. Основной – нарушение функции внутриклеточных ферментов антиоксидантной защиты (например, глутатион пероксидазы – GPX4);

2. Дополнительный – подавление работы мембранных цистин/глутамат белков-переносчиков (система хс⁻) или активация переносчиков железа, таких как серотрансферрин или лактоферрин.

Предпосылками к терапевтическому воздействию послужили результаты проведенных предклинических исследований, в которых было показано: 1) эрастин (активатор ферроптоза) является селективным триггером клеточной гибели при наличии мутаций в онкогенах (подобного эффекта при RAS дикого типа не наблюдалось); 2) активация сигнального пути RAS-

RAF-МЕК-ERK способствует эрастин-индуцированному торможению опухолевого роста; 3) железо необходимо для эрастин-индуцированной клеточной гибели [1].

Поэтому сегодня изучаются следующие группы препаратов для индукции ферроптоза как элемента терапевтической стратегии:

1) Препараты, подавляющие активность антиоксидантной защиты:

а. ингибиторы глутатиона (ацетаминофен, цисплатин);

б. ингибиторы системы хс⁻ (глутамат, ИФН-гамма, сорафениб, сульфасалазин, темозоламид);

с. ингибиторы GPX4 (алтретамин, гемцитабин).

2) Индукторы свободных радикалов (артезунат, витамин С).

3) Препараты, повышающие внутриклеточное железо (цитрат железа, лапатиниб, доксорубин, салиномицин).

4) Ингибиторы митохондрий (залцитабин, тигециклин).

5) Ингибиторы кофермента Q10 (статины).

6) Стимуляторы транскрипционных факторов (витамин С).

С другой стороны, применение препаратов, связывающих железо (деферроксамин), на сегодняшний день активно изучается в комбинации с локальными методами лечения (трансартериальная химиоэмболизация) при опухолях, в патогенезе которых необходима высокая концентрация внутриклеточного железа (например, гепатоцеллюлярный рак) [1].

Учитывая все вышеизложенное, применение лекарственных препаратов, созданных на основе понимания механизмов гибели опухолевых клеток, является перспективным направлением терапевтического лечения. В этой связи возможна как комбинация традиционных подходов (цитостатики, иммунотерапия или облучение) с ингибиторами ключевых субстратов ферроптоза, так и монотерапия препаратами, которые способствуют метаболическому репрограммированию. Безусловно, для повышения эффективности подобного лечения необходим поиск предиктивных маркеров чувствительности для выбора «таргетной» метаболической терапии.

Список литературы

1. Chen X., Kang R., Kroemer G. & Tang D. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2021.
2. Xu G., Wang H., Li X., Huang R. & Luo, L. Recent progress on targeting ferroptosis for cancer therapy // *Biochem Pharmacol.* – 2021. – 114584.
3. Shi Z., Zhang L., Zheng J., Sun H. & Shao C. Ferroptosis: Biochemistry and Biology in Cancers // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – 579286.
4. Dixon S.J., et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – P. 1060–1072.

5. Yang W.S., et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – Vol. 113. – E4966-75.
6. Ying J.F., et al. The role of iron homeostasis and iron-mediated ROS in cancer // Am J Cancer Res. – 2021. – Vol. 11. – P. 1895–1912.
7. Fonseca-Nunes A., Jakszyn P. & Agudo A. Iron and cancer risk- a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2014. – Vol. 23. – P. 12–31.
8. Yonezawa M., Back S.A., Gan X., Rosenberg P.A. & Volpe J.J. Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor // J Neurochem. – 1996. – Vol. 67. – P. 566–573.
9. Torti S.V. & Torti F.M. Iron and Cancer: 2020 Vision // Cancer Res. – 2020.
10. Ye Z., et al. Ferroptosis: Final destination for cancer // Cell Prolif. – 2020. – Vol. 53. – e12761.
11. Li C., et al. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death // Autophagy. – 2021. – Vol. 17. – P. 948–960.
12. Wu Y., et al. Ferroptosis in Cancer Treatment: Another Way to Rome // Front Oncol. – 2020. – V.10. – 571127.
13. Doll S., et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition // Nat Chem Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 91–98.
14. Li D. & Li Y. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer // Signal Transduct Target Ther. – 2020. – Vol. 5. – P. 108.
15. Zhu J., et al. The Molecular Mechanisms of Regulating Oxidative Stress-Induced Ferroptosis and Therapeutic Strategy in Tumors // Oxid Med Cell Longev. – 2020. – 8810785.
16. Jiang M., et al. Targeting ferroptosis for cancer therapy: exploring novel strategies from its mechanisms and role in cancers // Transl Lung Cancer Res. – 2020. – Vol. 9. – P. 1569–1584.
17. Jankowski C.S.R. & Rabinowitz J.D. Selenium modulates cancer cell response to pharmacologic ascorbate // Cancer Res. – 2022. – CAN-22.
18. Li J., et al. Ferroptosis: past, present and future // Cell Death Dis. – 2020. – Vol. 11. – P. 88.
19. Eagle H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture // J Exp Med. – 1955. – Vol. 102. – P. 37–48.
20. Yang W.S., et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 // Cell. – 2014. – Vol. 156. – P. 317–331.
21. Hassannia B., Vandenberghe P. & Vandenberghe T. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer // Cancer Cell. – 2019. – Vol. 35. – P. 830–849.
22. Lin H.Y., Ho H.W., Chang Y.H., Wei C.J. & Chu P.Y. The Evolving Role of Ferroptosis in Breast Cancer: Translational Implications Present and Future // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13. – P. 4576.
23. Gan B. Mitochondrial regulation of ferroptosis // J Cell Biol. – 2021. – Vol. 220. – e202105043.
24. Liu J., Kang R. & Tang D. The Art of War: Ferroptosis and Pancreatic Cancer // Front Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – 773909.

References

1. Chen X., Kang R., Kroemer G. & Tang D. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2021.
2. Xu G., Wang H., Li X., Huang R. & Luo, L. Recent progress on targeting ferroptosis for cancer therapy. Biochem Pharmacol. 2021; 114:584.
3. Shi Z., Zhangu L., Zheng J., Sun H. & Sbao C. Ferroptosis: Biochemistry and Biology in Cancers. Front Oncol. 2021; 11: 579286.
4. Dixon S.J., et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012; 149: 1060-1072.
5. Yang W.S., et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113: E4966-75.
6. Ying J.F., et al. The role of iron homeostasis and iron-mediated ROS in cancer. Am J Cancer Res. 2021; 11: 1895-1912.
7. Fonseca-Nunes A., Jakszyn P. & Agudo A. Iron and cancer risk – a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014; 23: 12-31.
8. Yonezawa M., Back S.A., Gan X., Rosenberg P.A. & Volpe J.J. Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor. J Neurochem. 1996; 67: 566-573.
9. Torti S.V. & Torti F.M. Iron and Cancer: 2020 Vision. Cancer Res. 2020.
10. Ye Z., et al. Ferroptosis: Final destination for cancer. Cell Prolif. 2020; 53: e12761.
11. Li C., et al. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death. Autophagy. 2021; 17: 948-960.
12. Wu Y., et al. Ferroptosis in Cancer Treatment: Another Way to Rome. Front Oncol. 2020; 10: 571127.
13. Doll S., et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. Nat Chem Biol. 2017; 13: 91-98.
14. Li D. & Li Y. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020; 5: 108.
15. Zhu J., et al. The Molecular Mechanisms of Regulating Oxidative Stress-Induced Ferroptosis and Therapeutic Strategy in Tumors. Oxid Med Cell Longev. 2020; 8810785.

16. Jiang M., et al. Targeting ferroptosis for cancer therapy: exploring novel strategies from its mechanisms and role in cancers. *Transl Lung Cancer Res.* 2020; 9: 1569-1584.
17. *Jankowski C.S.R. & Rabinowitz J.D.* Selenium modulates cancer cell response to pharmacologic ascorbate. *Cancer Res.* 2022; CAN-22.
18. *Li J., et al.* Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2020; 11: 88.
19. *Eagle H.* The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. *J Exp Med.* 1955; 102: 37-48.
20. *Yang W.S., et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell.* 2014; 156: 317-331.
21. *Hassammia B., Vandenabeele P. & Vanden Berghe T.* Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell.* 2019; 35: 830-849.
22. *Lin H.Y., Ho H.W., Chang Y.H., Wei C.J. & Chu P.Y.* The Evolving Role of Ferroptosis in Breast Cancer: Translational Implications Present and Future. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 4576.
23. *Gan B.* Mitochondrial regulation of ferroptosis. *J Cell Biol.* 2021; 220: e202105043.
24. *Liu J., Kang R. & Tang D.* The Art of War: Ferroptosis and Pancreatic Cancer. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 773909.