



DOI: <https://doi.org/10.15688/jvolsu11.2018.1.10>

UDC 542.943-92'78:616-006

LBC 52.5

**ACTIVATION OF AUUTOPHAGY
IN TUMOR CELLS BY SYNTHETIC MONOPHENOL ANTIOXIDANTS:
DEPENDENCE ON STRUCTURE AND CONCENTRATION**

Elena B. Menshchikova

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Anton V. Chechushkov

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Petr M. Kozhin

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Sergey V. Kholshin

Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation

Natalya V. Kandalintseva

Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation

Grigoriy G. Martinovich

Belarus State University, Minsk, Republic Belarus

Nikolay K. Zenkov

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The present research is devoted to the study of the relationship between the structure of the original synthetic monophenolic antioxidants and their ability to influence the activity of autophagy in tumor cells.

Key words: synthetic monophenolic antioxidants, autophagy, tumor cells.

УДК 542.943-92'78:616-006

ББК 52.5

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОНОФЕНОЛЬНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ
АКТИВИРУЮТ АУТОФАГИЮ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ:
ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СТРУКТУРЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ**

Елена Брониславовна Меньщикова

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация

Антон Владимирович Чечушков

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация

Петр Михайлович Кожин

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация

Сергей Викторович Хольшин

Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск, Российская Федерация

Наталья Валерьевна Кандалинцева

Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск, Российская Федерация

Григорий Григорьевич Мартинович

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Николай Константинович Зенков

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация. Настоящее исследование посвящено изучению зависимости между структурой оригинальных синтетических монофенольных антиоксидантов и их способностью влиять на активность аутофагии в опухолевых клетках.

Ключевые слова: синтетические монофенольные антиоксиданты, аутофагия, опухолевые клетки.

Введение. Активированные кислородные метаболиты (АКМ) в нормальных условиях являются важными регуляторами биологических процессов, однако часто, особенно при патологических процессах, их гиперпродукция приводит к развитию окислительного стресса [2]. Для поддержания низкого уровня АКМ в клетках служит многоуровневая система эндогенных и экзогенных антиоксидантов. Последние наиболее широко представлены фенольными соединениями, помимо непосредственного антирадикального эффекта способными оказывать непрямо защитное действие при окислительном стрессе, в том числе благодаря способности индуцировать аутофагию [4; 6].

Одним из наиболее неоднозначных патологических состояний в плане изменения редокс-баланса и перспектив фармакологического воздействия на него относится опухолевый рост. Целью настоящего исследования послужило изучение зависимости между структурой оригинальных синтетических монофенольных антиоксидантов и их способностью влиять на активность аутофагии в опухолевых клетках.

Материал и методы. По описанной ранее [1; 3] последовательности превращений синтезированы четыре оригинальных гидрофильных фенольных соединения структурно взаимосвязанного ряда: 3-(3'-трет-бутил-4'-гид-

роксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 3-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17) и 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13); их строение подтверждали данными элементного анализа, ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии. Выраженность аутофагии в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 оценивали с помощью визуализации внутриклеточных везикул, позитивных по маркеру LC3В (аутофагосом), на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710. Фармакологическое воздействие на клетки осуществляли в течение 24 ч; для сравнения выраженности образования аутофагосом и скорости их лизосомальной деградации каждую точку дублировали экспериментом с добавлением в культуральную среду помимо тестируемого соединения хлорохина в концентрации 60 мкМ за 1 ч до выведения из эксперимента. В ходе непрерывного процесса аутофагии LC3В-позитивные везикулы постоянно деградируют в лизосомах; добавление хлорохина блокирует аутофагосомально-лизосомальное слияние, а наблюдаемое при этом количество аутофагосом отражает интенсивность их формирования. Соотношение количества аутофагосом в группах с хлорохином и без него (коэффициент k_{CQ}) отражает способность клеток удалять

вновь формирующиеся аутофагосомы [5], будучи важным показателем защитных свойств аутофагии. Изображения анализировали и обрабатывали с помощью программы CellProfiler: сегментировали ядра клеток по маркеру DAPI, затем для выделения клеток сегментировали сигнал от LC3B, ассоциированный с каждым ядром, разделяли каждый объект на цитоплазматический и ядерный компартменты и накладывали полученные контуры на исходное изображение с целью сегментирования везикул и их ассоциации с цитоплазматическими компартментами, для которых собирали данные о суммарной и средней интенсивности флуоресценции флуорохрома, отражающей количество белка LC3B. Данные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов, для оценки различий использовали критерии Манна – Уитни и Данна.

Результаты. Для контрольных клеток наблюдалось характерное различие в количестве детектируемых аутофагосом при воздействии хлорохином и без него (рис., а). Исследованные соединения, за исключением ТС-13, в концентрации 5 мкМ несколько снижали скорость формирования новых аутофагосом (группа с хлорохином, рис., а) и темпы

удаления образовавшихся аутофагосом (коэффициент k_{CQ} , рис., б), в то время как при инкубировании клеток MCF-7 в присутствии 20 мкМ соединений последний показатель неизменно увеличивался, сравниваясь с контролем (ТС-12) либо превышая его (ТС-13, С-13); для соединения ТС-17 (полностью экранированного монофенола) отмечаются низкие показатели удаления аутофагосом, что отражается в уменьшении коэффициента k_{CQ} .

Таким образом, можно заключить, что установленная нами ранее способность новых водорастворимых монофенольных антиоксидантов, различающихся количеством *трет*-бутильных заместителей и строением *пара*-алкильного заместителя ОН-группы, угнетать жизнеспособность опухолевых клеток линии MCF-7 [1], обусловлена в том числе активацией аутофагии; эффект зависит от структуры и концентрации соединения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсично-

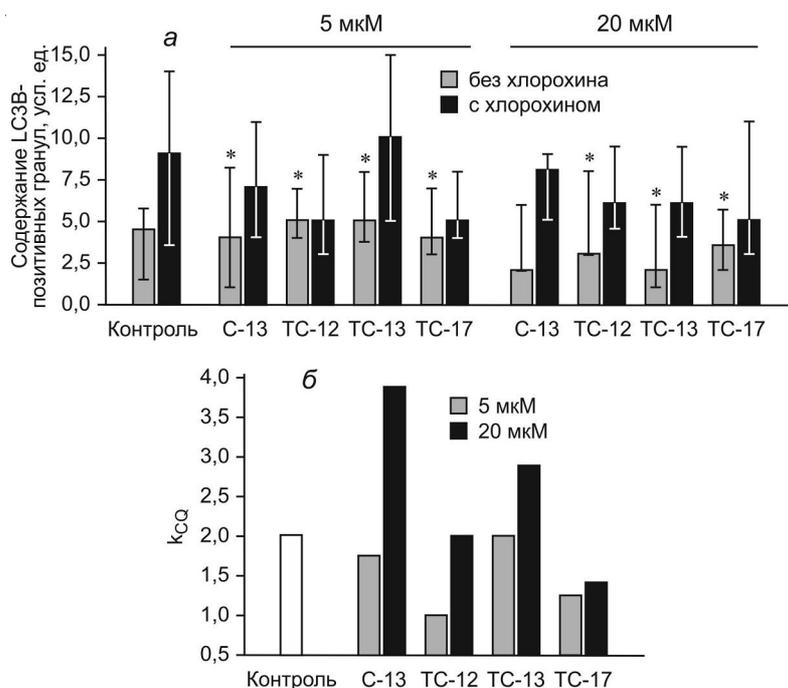


Рис. 1. Влияние тестируемых монофенолов на процессы аутофагии в клетках MCF-7: содержание LC3B-позитивных везикул (а) и величину коэффициента k_{CQ} (б); * – отличие от контроля ($p < 0,05$)

стью в отношении опухолевых клеток / П. И. Гайнутдинов [и др.] // Сибирский научн. мед. журн. – 2018. – Т. 38, № 1. – С. 22–31.

2. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

3. Олейник, А. С. Синтез и антиоксидантные свойства *S*-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия / А. С. Олейник, Т. С. Куприна, Н. Ю. Певнева // Известия АН. Сер. хим. – 2007. – № 6. – С. 1094–1101.

4. Растительные фенолы и аутофагия / Н. К. Зенков [и др.] // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 4. – С. 429–447.

5. Klionsky, D. J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) / D. J. Klionsky [et al.] // Autophagy. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 1–222.

6. Nabavi, S. F. Regulation of autophagy by polyphenols: Paving the road for treatment of neurodegeneration / S. F. Nabavi [et al.] // Biotechnol. Adv. – 2017. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.001.

Information about the Authors

Elena B. Menshchikova, Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Timakova St., 2, 630117 Novosibirsk, Russian Federation, lemen@soramn.ru.

Anton V. Chechushkov, Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor, Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Timakova St., 2, 630117 Novosibirsk, Russian Federation, ahechushkov@gmail.com.

Petr M. Kozhin, Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Timakova St., 2, 630117 Novosibirsk, Russian Federation, kozhinpm@gmail.com.

Sergey V. Kholshin, Senior Lecturer, Department of Chemistry, Novosibirsk State Pedagogical University, Vilyuyskaya St., 28, 630126 Novosibirsk, Russian Federation, aquaphenol@mail.ru.

Natalya V. Kandalintseva, Candidate of Sciences (Chemistry), Associate Professor, Director of the Institute of Natural, Social and Economic Sciences, Novosibirsk State Pedagogical University, Vilyuyskaya St., 28, 630126 Novosibirsk, Russian Federation, aquaphenol@mail.ru.

Grigoriy G. Martinovich, Doctor of Sciences (Biology), Associate Professor, Head of Department of Biophysics, Belarus State University, Prosp. Nezavisimosti, 4, 220030 Minsk, Republic of Belarus, martinovichgg@bsu.by.

Nikolay K. Zenkov, Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Timakova St., 2, 630117 Novosibirsk, Russian Federation, lemen@centercem.ru.

Информация об авторах

Елена Брониславовна Меньщикова, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, 630117 г. Новосибирск, Российская Федерация, lemen@soramn.ru.

Антон Владимирович Чечушков, кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, 630117 г. Новосибирск, Российская Федерация, ahechushkov@gmail.com.

Петр Михайлович Кожин, научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, 630117 г. Новосибирск, Российская Федерация, kozhinpm@gmail.com.

Сергей Викторович Хольшин, старший преподаватель, кафедра химии, Новосибирский государственный педагогический университет, ул. Виллюйская, 28, 630126 г. Новосибирск, Российская Федерация, aquarphenol@mail.ru.

Наталья Валерьевна Кандалинцева, кандидат химических наук, доцент, директор института естественных и социально-экономических наук, Новосибирский государственный педагогический университет, ул. Виллюйская, 28, 630126 г. Новосибирск, Российская Федерация, aquarphenol@mail.ru.

Григорий Григорьевич Мартинович, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биофизики, Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь, martinovichgg@bsu.by.

Николай Константинович Зенков, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, 630117 г. Новосибирск, Российская Федерация, lemen@centercem.ru.