

DOI: 10.1134/S0041377118120076

АКТИВАЦИЯ АУТОФАГИИ И Nrf2-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MCF-7 НОВЫМИ МОНОФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

© Е. Б. Меньщикова,^{1,*} А. В. Чечушков,¹ П. М. Кожин,¹ С. В. Хольшин,²
Н. В. Кандалинцева,² Г. Г. Мартинович,³ Н. К. Зенков¹

¹ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины, Новосибирск, 630117,

² Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, 630126, и

³ Белорусский государственный университет, Минск, 220030;

* электронный адрес: lemen@centersect.ru

С целью поиска новых препаратов для профилактики развития неопластических процессов и вспомогательных средств терапии злокачественных новообразований исследовали *in vitro* способность новых водорастворимых монофенольных соединений структурно взаимосвязанного ряда влиять на активность двух важнейших механизмов поддержания внутриклеточного гомеостаза — аутофагии и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE — в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Использовали конфокальную микроскопию. Процессы аутофагии анализировали по изменению содержания внутриклеточных везикул, позитивных по маркеру аутофагосом (LC3B), наличие способности активировать систему Keap1/Nrf2/ARE определяли по влиянию соединений на транслокацию транскрипционного фактора Nrf2 в ядро. Установлено, что исследованные вещества по-разному влияли на скорость образования аутофагосом в зависимости от структуры и концентрации; при дополнительном введении в среду культивирования блокатора аутофагосомально-лизосомального слияния хлорохина обнаружено, что в концентрации 20 мкМ несимметрично экранированные *трет*-бутильными группами фенолы с тиосульфатной (ТС-13) и сульфатной группами в *пара*-пропильном заместителе увеличивают скорость удаления аутофагосом в клетках MCF-7, укорочение *пара*-алкильного заместителя на одно метиленовое звено отменяет эффект, а добавление второго орто-*трет*-бутильного заместителя — обращает. Из двух протестированных соединений оба усиливали транслокацию транскрипционного фактора Nrf2 в ядро клеток MCF-7 (ключевой момент активации системы Keap1/Nrf2/ARE): несимметрично экранированные *трет*-бутильной группой фенолы с селеносульфонатной группой в *пара*-пропильном заместителе (5–100 мкМ) — через 4 ч, ТС-13 (5–100 мкМ) — через 24 ч после добавления в среду культивирования. Исходя из полученных нами ранее сведений об особенностях токсичности данной группы соединений в отношении клеток MCF-7 можно заключить, что они связаны с различием влияния веществ на аутофагию и активацию сигнальной системы антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE.

Ключевые слова: клетки MCF-7, система Keap1/Nrf2/ARE, ядерно-цитоплазматическое соотношение, аутофагосомы, LC3B, хлорохин, синтетические монофенолы

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ТС-12 — 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия, ТС-13 — 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия, ТС-17 — 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия, С-13 — 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия, СеС-13 — 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия, ЯЦ — ядерно-цитоплазматическое соотношение, ARE — антиоксидант-респонс(ив)ный элемент, FBS — фетальная бычья сыворотка, LC3B — легкая цепь 3β ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B, Nrf2 — фактор 2, родственник NF-E2, Keap1 — Kelch-подобный белок 1, ассоциированный с ECH, p62/SQSTM — убиквитинсвязывающий белок p62, он же секвестосома 1.

Активные формы кислорода (АФК) и азота радикальной ($O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} , RO^{\cdot} и др.) и нерадикальной (H_2O_2 , $HONO$ и $ROOH$) природы в нормальных условиях являются важными регуляторами биологических процес-

сов, однако часто, особенно при патологических процессах, их действие становится токсичным и деструктивным. Это явление получило название окислительный стресс (Niki, 2016; Sies et al., 2017; Chikara et al., 2018; Kapuy

et al., 2018). Для поддержания низкого уровня АФК в клетках служит многоуровневая система антиоксидантов ферментативной (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и др.) и неферментативной (глутатион и другие SH-содержащие соединения, фенолы) природы. Длительное время антиоксидантная активность фенолов рассматривалась с позиций их антирадикального действия и способности выступать хелаторами ионов металлов переменной валентности, тем самым прерывая цепные процессы свободнорадикального окисления (Меньщикова и др., 2012). В последние годы выявлены и стали активно изучаться механизмы непрямого защитного действия фенолов при окислительном стрессе, а именно их способности индуцировать аутофагию и активировать сигнальную систему антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE (Зенков и др., 2016; Nabavi et al., 2017; Shabalala et al., 2017; Zhao et al., 2018).

Аутофагия как основной способ деградации внутриклеточных компонентов (белков, нуклеиновых кислот, жировых накоплений и органелл) представляет собой важный элемент защиты при окислительном и карбонильном стрессах. С ее помощью удаляются поврежденные митохондрии и пероксисомы, выступающие эффективными внутриклеточными источниками АФК, а также белковые и липидные агрегаты, образование которых является главной причиной цитотоксического действия карбонильных соединений (Fedorova et al., 2014; Giordano et al., 2014).

Сегодня известно более 20 редокс-чувствительных факторов транскрипции, среди которых особое место занимает Nrf2, регулирующий экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE. В клетках Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1, являющегося своеобразным молекулярным сенсором изменения внутриклеточного редокс-баланса. Главным назначением редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптозинулирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. ARE контролирует экспрессию более 500 генов, среди которых можно выделить две большие группы антиоксидантных ферментов и ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков (Турпаев, 2013). Биологическая важность системы Keap1/Nrf2/ARE, регулирующей внутриклеточный редокс-баланс, определяется тем, что она контролирует активность широкого спектра редокс-чувствительных факторов транскрипции, а также метаболических процессов с участием фосфатаз и киназ; доказано взаимное усиление активности Nrf2-опосредованных процессов и аутофагии, обусловленное как дегра-

дацией Keap1 при участии адаптерного белка аутофагии p62/SQSTM1 (Зенков и др., 2017), так и наличием элементов ARE в промоторах многих генов аутофагии (Pajares et al., 2017). Поэтому в последние годы идет активный поиск и исследование новых активаторов и ингибиторов транскрипционной активности Nrf2 и аутофагии в целях профилактики и терапии широкого спектра заболеваний (Зенков и др., 2013; Gazaryan, Thomas, 2016; Chu et al., 2017).

Практическое применение и исследование природных фенолов во многом затруднены их гидрофобностью и сложностью структурной организации молекул. Ранее нами выполнен цикл работ, в которых удалось установить взаимосвязь между строением структурно связанного ряда оригинальных гидрофильных монофенолов и их антиоксидантной и биологической активностью в системах *in vitro* и *in vivo*, показана способность веществ не только прямо ингибировать свободнорадикальные окислительные процессы с участием АФК, но и подавлять развитие окислительного стресса опосредованно через активацию внутриклеточных защитных систем.

Цель настоящего исследования — изучение зависимости между структурой новых синтетических монофенольных антиоксидантов и их способностью влиять на активность аутофагии и Nrf2-опосредованных процессов.

Материал и методика

Синтезированы пять оригинальных гидрофильных фенольных соединений структурно взаимосвязанного ряда: 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилсульфонат натрия (ТС-12), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (ТС-13), 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (ТС-17), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия (СеС-13) и 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13), структурные формулы которых показаны на рис. 1. Соединения получали из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по последовательности превращений, описанной ранее (Олейник и др., 2007; Гайнутдинов и др., 2018), их строение подтверждали данными элементного анализа, ЯМР- и УФ-спектроскопии.

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, которые культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1 % пенициллина и 1 % стрептомицина, 1 % глутамина. После достижения культуры 90%-ной конfluenceности клетки снимали пипетированием и пас-

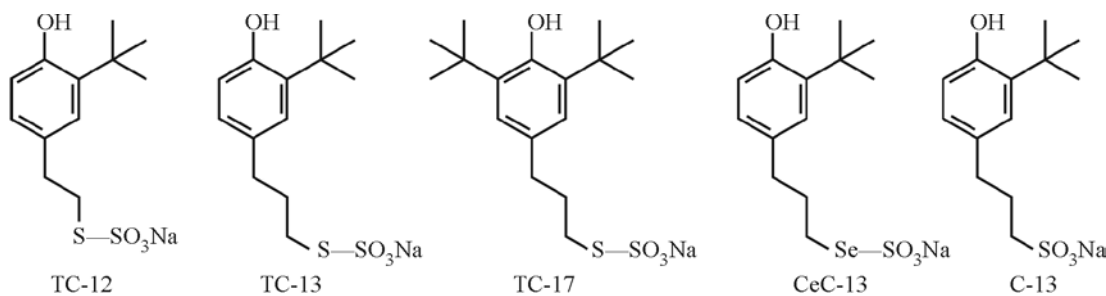


Рис. 1. Структурные формулы использованных синтетических монофенолов.

Объяснения см. в разделе «Материал и методика».

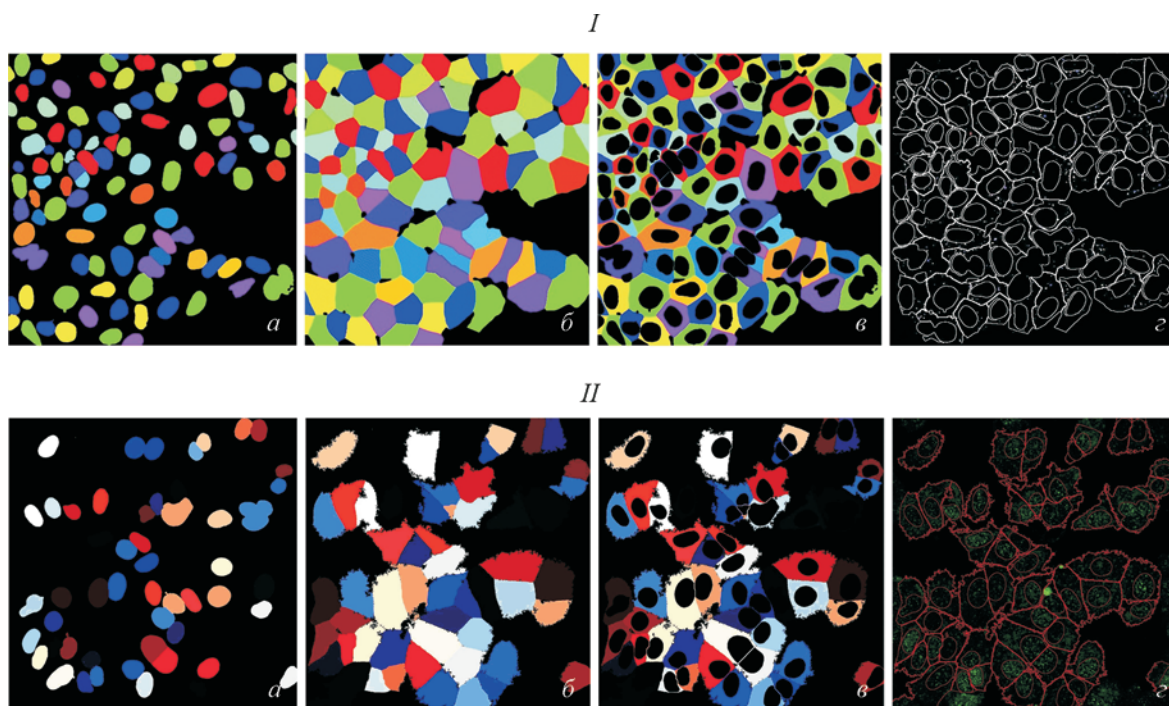


Рис. 2. Последовательность сегментирования клеток при исследовании аутофагии (I) и ядерно-цитоплазматического соотношения Nrf2 (II).

a — сегментирование ядер; *б* — сегментирование цитоплазмы вокруг ядер; *в* — формирование областей цитоплазмы; *г* — идентификация везикул внутри областей цитоплазмы (I) или наложение контуров цитоплазмы на исходное изображение (II). Псевдоцвета на фрагментах (*a–в*) присвоены для удобства восприятия отдельных клеток.

сировали в количестве $25 \cdot 10^3$ на лунку стерильного тонкодонного планшета. Экспериментальное фармакологическое воздействие на клетки осуществляли через 24 ч после рекультивирования. Тестируемое соединение разводили в предварительно разогретой стерильной деионизированной воде качества *miliQ*, так чтобы каждая аликвота являлась 200-кратным стоковым раствором для каждой исследуемой концентрации препарата. Аликвоты добавляли в культуральные среды в отдельных пробирках на 5 мин при 37°C , после чего полученными растворами заменяли культуральные среды клеток, подготовленных для эксперимента, и культивировали в течение 24 ч. Для сравнения выраженности образования аутофagosом и скорости их лизосомальной деградации каждую экспериментальную точку дублировали экспериментом, в котором в культуральную среду через 23 ч после добавления тестируемого соединения вводили 60 мкМ хлорохина (блокатор слияния аутофagosом и лизосом; C6628, Sigma, США) и культивировали еще в течение 1 ч.

Через 24 ч после введения тестируемых соединений среду удаляли, клетки фиксировали в 10%-ном формалине, пермеабелизировали в 0.15%-ном растворе тритона X-100, после чего покрывали 200 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 5 % бычьего сывороточного альбумина и 0.05 % Тритона X-100) и инкубировали в шейкер-термостате (40 мин, 37°C). Далее блокирующий раствор меняли на аналогичный (но без сыворотки), содержащий антитела кролика против белка LC3B млекопитающих (L10382, Invitrogen, США), и проводили гибридизацию (60 мин, 37°C). После трехкратной 5-минутной отмывки бессывороточным блокирующим раствором выполняли гибридизацию с антителами против кроличьих антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa

Fluor 488 (Abcam, США) (30 мин, 37°C), затем PBS удаляли коротким промыванием деионизированной водой и заключали клетки в монтирующую среду FluoroShield, содержащую интеркалирующий краситель DAPI для окраски ядер (Abcam, США). Внутриклеточную локализацию LC3B исследовали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss AG, ФРГ), используя объектив Plan-Apochromat $63\times/1.4$.

Изображения анализировали и обрабатывали с помощью программы CellProfiler (<http://cellprofiler.org>). Для компьютерного анализа сегментировали ядра клеток по маркеру DAPI (рис. 2, I, *a*), затем для выделения клеток сегментировали суммарный сигнал от LC3B (изображения соответствующего канала флуоресценции трансформировали гауссовым фильтром), ассоциированного с каждым ядром (рис. 2, I, *б*), после чего разделяли каждый объект на цитоплазматический и ядерный компартменты (рис. 2, I, *в*) и накладывали полученные контуры цитоплазмы на исходное изображение с целью сегментирования везикул и их ассоциации с цитоплазматическими компартментами (рис. 2, I, *г*), для которых собирали данные о суммарной и средней интенсивности флуоресценции флуорохрома, отражающей количество белка LC3B.

Наличие у синтезированных соединений способности активировать редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE определяли по их влиянию на транскодацию транскрипционного фактора Nrf2 в ядро (Зенков и др., 2017). Для этих исследований выбраны соединения TC-13 и CeC-13 как проявившие соответственно минимальную и максимальную токсичность в отношении опухолевых клеток человека (Гайнутдинов и др., 2018). Культивирование клеток MCF-7, инкубирование с тести-

руемыми соединениями и подготовку препаратов проводили в условиях, аналогичных описанным выше; использовали два временных интервала — 4 и 24 ч. Гибридизацию первичными антителами кролика к Nrf2 (ab31163, Abcam, Великобритания) производили в течение 1 ч при 37 °С, затем клетки 3 раза отмывали, выполняли гибридизацию со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (30 мин, 37 °С), и после отмывки заключали в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую краситель DAPI. Внутриклеточную локализацию Nrf2 исследовали на том же лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710.

Изображения анализировали и обрабатывали с помощью программы CellProfiler описанным выше способом: для компьютерного анализа ядерной транслокации Nrf2 сегментировали ядра клеток по маркеру DAPI (рис. 2, II, а), затем для выделения клеток сегментировали сигнал от Nrf2, ассоциированного с каждым ядром (рис. 2, II, б), после чего разделяли каждый сегментированный объект на цитоплазматический и ядерный компартменты (рис. 2, II, в) и накладывали полученные контуры на исходное изображение (рис. 2, II, з). Для каждого компартмента собирали данные о суммарной и средней интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488, отражающей количество белка Nrf2. Для проведения анализа все сегментированные клетки каждой группы объединяли в одну клеточную популяцию, после чего исследовали распределение значений ядерно-цитоплазматического соотношения флуоресценции и интенсивностей флуоресценции в ядре и цитоплазме.

Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Непрерывные переменные представлены при нормальном распределении в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения, при распределении, отличном от нормального, — в виде медианы и межквартильных интервалов. Для оценки различий количественных данных использовали критерии Манна—Уитни и Данна. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (P) принимали равным 0.05.

Результаты и обсуждение

Как сказано в разделе «Материал и методика», выраженность аутофагии оценивали с помощью визуализации аутофагосом, внутриклеточных везикул, позитивных по маркеру LC3B. Следует отметить, что в клетках MCF-7 в норме наблюдается определенное количество везикулярных структур различной интенсивности и размеров. Поскольку размер большинства аутофагосом в действительности ниже предела разрешающей способности оптического микроскопа (за исключением систем класса SuperResolution), единственным объективным критерием выделения внутриклеточного объекта в качестве аутофагосомы является характеристика интенсивности флуоресцентного сигнала от везикулы.

Для всех экспериментальных точек было проведено исследование с хлорохином и без него. Золотым стандар-

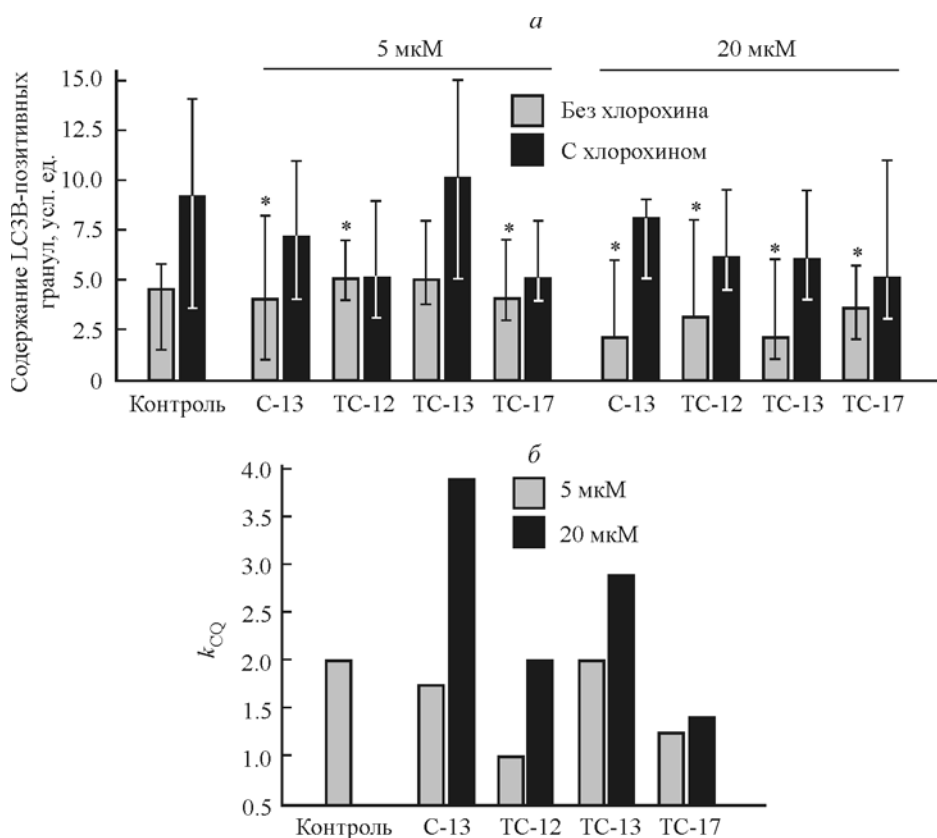


Рис. 3. Влияние монофенолов на содержание LC3B-позитивных аутофагосомных везикул (а) и величину коэффициента k_{CQ} (б) в клетках MCF-7 в контроле и в присутствии хлорохина (1 ч).

Представлены медианы значений и интерквартильные размахи; звездочкой показана достоверность отличий от соответствующего контроля ($P < 0.05$).

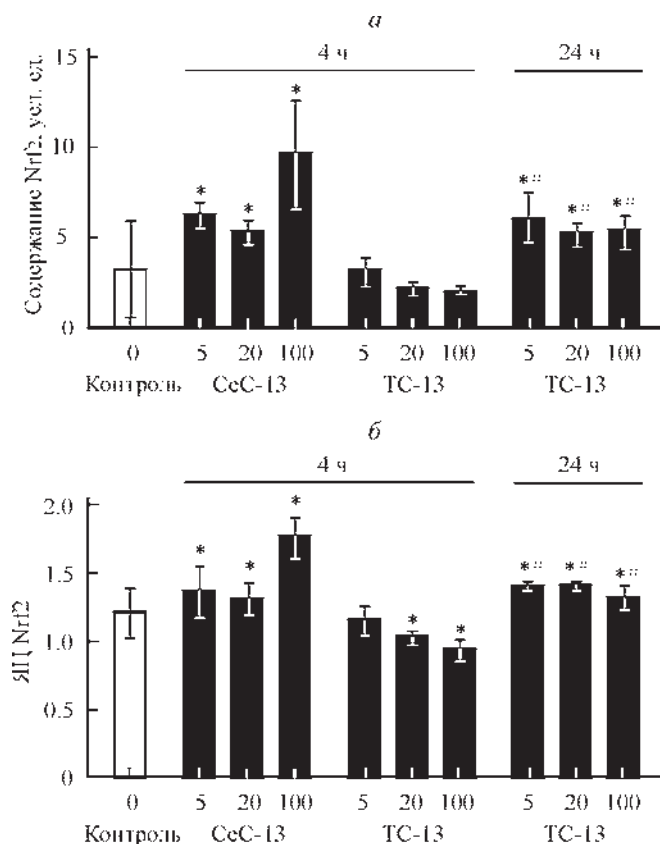


Рис. 4. Содержание Nrf2 в ядре (а) и ядерно-цитоплазматическое (ЯЦ) соотношение содержания Nrf2 в клетках MCF-7 (б) через 4 и 24 ч действия монофенолов TC-13 и CeC-13 в концентрациях 5, 20 и 100 мкМ.

Показаны средние и средноквадратичные отклонения, а также достоверность отличий от величин контроля (звездочка) и предыдущего срока инкубирования (решетка) ($P < 0.05$). Через 24 ч культивирования с CeC-13 анализ внутриклеточного содержания и распределения Nrf2 в клетках MCF-7 невозможен (см. текст).

том при определении активности аутофагии служит регистрация аутофагического потока (autophagic flux): в ходе непрерывного процесса LC3B-позитивные аутофагосомы постоянно деградируют в лизосомах, а добавление хлорохина блокирует аутофагосомно-лизосомное слияние, и

наблюдаемое при этом количество аутофагосом отражает интенсивность их формирования. Соотношение количества аутофагосом в группах с хлорохином и без него (коэффициент k_{CO}) отражает способность клеток удалять вновь формирующиеся аутофагосомы (Klionsky et al., 2016), являясь важным показателем защитных свойств аутофагии.

В силу высокой токсичности селенсодержащего аналога через 24 ч инкубирования с CeC-13 клетки MCF-7 утрачивали морфологические признаки адгезионных клеток, анализ внутриклеточного образования и распределения аутофагосом (LC3B-позитивных везикул) в этой временной точке был невозможен, поэтому данных по этому соединению не представлено. Для контрольных клеток наблюдали характерное различие количества детектируемых аутофагосом при воздействии хлорохином и без него (рис. 3, а). Исследованные соединения, за исключением TC-13, в концентрации 5 мкМ несколько снижали скорость формирования новых аутофагосом (группа с хлорохином, рис. 3, а) и темпы удаления образовавшихся аутофагосом (коэффициент k_{CO} , рис. 3, б), в то время как при более высокой концентрации соединений (20 мкМ) этот показатель неизменно увеличивался, сравниваясь с контролем (в случае с TC-12) либо превышая его (TC-13 и C-13); для соединения TC-17 (полностью экранированного монофенола) отмечаются низкие показатели удаления аутофагосом, что отражается в уменьшении коэффициента k_{CO} .

При исследовании влияния монофенолов на активность Nrf2-зависимого сигнального пути обнаружено, что через 4 ч инкубирования CeC-13 способствовал выраженному дозозависимому увеличению содержания Nrf2 в ядре клеток MCF-7 (рис. 4, а), в концентрации 100 мкМ — за счет повышения ядерной транслокации транскрипционного фактора (рис. 4, б). Как упомянуто выше, через 24 ч действия CeC-13 клетки MCF-7 утрачивали морфологические признаки адгезионных клеток, делая невозможным анализ внутриклеточного содержания и распределения в них Nrf2; с токсичностью же, вероятно, связана и способность соединения индуцировать гомеостатическую систему Keap1/Nrf2/ARE. При культивировании клеток в присутствии TC-13 суммарный анализ клеточной популяции показал, что монофенол вначале уменьшал ядерно-цитоплазматическое (ЯЦ) соотношение, не влияя на концентрацию Nrf2 в ядре (4 ч), а затем

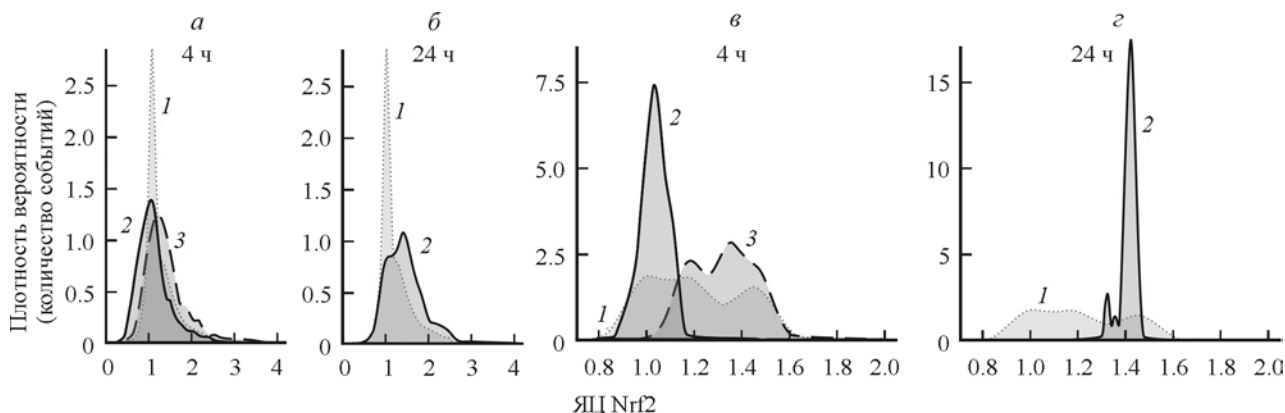


Рис. 5. Примеры гистограмм распределения флуоресценции суммарной клеточной популяции (а, б) и ее средних значений по отдельным полям зрения (в, г) в зависимости от ядерно-цитоплазматического (ЯЦ) соотношения содержания Nrf2 в клетках MCF-7 в контроле (1) и при культивировании в присутствии монофенолов TC-13 (2) и CeC-13 (3) в концентрации 20 мкМ в течение разного времени.

(24 ч) увеличивал как содержание Nrf2 в ядре, так и его ЯЦ-отношение (рис. 4). Интересной особенностью полученных результатов, выявленных в результате анализа, является различие гистограмм распределения флуоресценции суммарной клеточной популяции (рис. 5, а, б) и гистограмм распределения средних значений флуоресценции по отдельным полям зрения (рис. 5, в, г): в первом случае распределения более консолидированы, чем во втором, когда становится очевидной разница между клетками по величине ЯЦ-отношения содержания Nrf2: так, при инкубировании клеток в присутствии 20 мкМ ТС-13 относительно небольшой пул клеток отвечает резким увеличением (более чем в 3 раза) величины показателя, в то время как суммирование и усреднение данных свидетельствуют о его кажущемся уменьшении, как указано выше.

Противоопухолевый эффект выявлен у многих растительных фенолов, при этом отмечается множественность механизмов их действия. Роль аутофагии в канцерогенезе и терапии рака сложна и зависит от стадии процесса, условий микроокружения опухолевых клеток и сценария лечения. С одной стороны, необратимое саморазрушение, вызванное массивной аутофагией, приводит к гибели клеток злокачественного новообразования (Klimaszewska-Wisniewska et al., 2016). С другой стороны, ингибирование аутофагии как предохранительного механизма опухолевых клеток позволяет преодолеть их химиорезистентность (Wang et al., 2018). В этом плане показательно, что ТС-17, обладавший наибольшей токсичностью (из четырех протестированных нами соединений) в отношении клеток MCF-7, угнетал как скорость образования, так и темпы удаления аутофагосом, остальные препараты в концентрации 20 мкМ усиливали аутофагию (коэффициент k_{CO}) в степени, реципрокной их токсичности (Гайнутдинов и др., 2018). В этой связи можно предположить, что чем сильнее клетка отвечает на соединение индукцией аутофагии (механизма самозащиты), тем менее выражен противоопухолевый эффект (Lee et al., 2016). Это может быть обусловлено парадоксальным прооксидантным эффектом исследуемых веществ, что косвенно подтверждается обратной зависимостью между их антиоксидантной активностью в бесклеточной системе и токсичностью в отношении клеток MCF-7 (Гайнутдинов и др., 2018).

К одному из ключевых механизмов противоопухолевого действия фенольных соединений относится их способность активировать систему Keap1/Nrf2/ARE (Rajagopal et al., 2018). Сети транскрипционных программ, управляемых фактором Nrf2 (главным образом антиоксидантных и детоксикационных), позволяют клетке адаптироваться и выживать в различных стрессовых условиях, что наряду с его противовоспалительным действием и влиянием на функционирование митохондрий и промежуточный метаболизм лежит в основе химиопрофилактических эффектов Nrf2, способности подавлять канцерогенез на стадии промоции (Dinkova-Kostova et al., 2017). В то же время клетки уже сформировавшейся опухоли способны эффективно использовать Nrf2, справедливо называемый «двуликим Янусом», для собственной защиты, и его высокая активность в разных образцах злокачественных новообразований дает плохой прогноз терапии, коррелируя со снижением продолжительности жизни больных (Kitamura, Motohashi, 2018). Мы склонны предполагать, что обнаруженная нами индукция системы Keap1/Nrf2/ARE в клетках MCF-7 в ответ на два протести-

рованных синтетических монофенола в данных условиях обусловлена не столько их непосредственной способностью увеличивать стабильность транскрипционного фактора Nrf2, сколько служит проявлением самозащиты опухолевых клеток в ответ на уменьшение редокс-буферной емкости (Мартинович и др., 2017), так же как и усиление аутофагии (Карцу et al., 2018).

Таким образом, можно заключить, что способность новых водорастворимых монофенольных антиоксидантов, различающихся количеством *трет*-бутильных заместителей и строением *пара*-алкильного заместителя ОН-группы, угнетать жизнеспособность опухолевых клеток линии MCF-7 (Гайнутдинов и др., 2018) сопровождается активацией сигнальной системы антиоксидант-рецепторного элемента Keap1/Nrf2/ARE и аутофагии; эффект зависит от структуры и концентрации соединения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-54-00050 Бел_а) и БРФФИ (проект М16Р-022) с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

Список литературы

- Гайнутдинов П. И., Кожин П. М., Чечушков А. В., Мартинович Г. Г., Хольшин С. В., Кандалинцева Н. В., Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б. 2018. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсичностью в отношении опухолевых клеток. Сиб. науч. мед. журн. 38 (1) : 22—31. (Gai-nutdinov P. I., Kozhin P. M., Chechushkov A. V., Martinovich G. G., Kholshin S. V., Kandalintseva N. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B. 2018. Inverse relationship between the antioxidant activity of structurally related synthetic monophenols and their toxicity in tumor cells. Sibirskiy Nauchnyy Meditsinskiy Zhurnal (Russian). 38 (1) : 22—31.)
- Зенков Н. К., Кожин П. М., Чечушков А. В., Мартинович Г. Г., Кандалинцева Н. В., Меньщикова Е. Б. 2017. Лабиринты регуляции Nrf2. Биохимия. 82 (5) : 757—767. (Zenk-ov N. K., Kozhin P. M., Chechushkov A. V., Martinovich G. G., Kandalintseva N. V., Menshchikova E. B. 2017. Mazes of Nrf2 regulation. Biochemistry (Moscow). 82 (5) : 556—564.)
- Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Ткачев В. О. 2013. Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень. Биохимия. 78 (1) : 27—47. (Zen-kov N. K., Menshchikova E. B., Tkachev V. O. 2013. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. Biochemistry (Moscow). 78 (1) : 19—36.)
- Зенков Н. К., Чечушков А. В., Кожин П. М., Кандалинцева Н. В., Мартинович Г. Г., Меньщикова Е. Б. 2016. Растительные фенолы и аутофагия. Биохимия. 81 (4) : 429—447. (Zen-kov N. K., Chechushkov A. V., Kozhin P. M., Kandalintseva N. V., Martinovich G. G., Menshchikova E. B. 2016. Plant phenols and autophagy. Biochemistry (Moscow). 81 (4) : 297—314.)
- Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Вчерашняя А. В., Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Кандалинцева Н. В., Черенкевич С. Н. 2017. Механизмы редокс-регуляции химиорезистентности опухолевых клеток фенольными антиоксидантами. Биофизика. 62 (6) : 1142—1152. (Martinovich G. G., Martinovich I. V., Vcherashniaya A. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B., Kandalintseva N. V., Cherenkevich S. N. 2017. Mechanisms of redox regulation of chemoresistance in tumor cells by phenolic antioxidants. Biophysics. 62 (6) : 942—949.)
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Кандалинцева Н. В. 2012. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ. 496 с. (Menshchikova E. B., Lankin V. Z., Kandalintseva N. V. 2012. Phenolic antioxidants in

biology and medicine. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ. (Russian). 496 p.)

Олейник А. С., Куприна Т. С., Певнева Н. Ю., Марков А. Ф., Кандалинцева Н. В., Прошенко А. Е., Григорьев И. А. 2007. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия. Изв. АН. Сер. хим. 6 : 1094—1101. (Oleynik A. S., Kuprina T. S., Pevneva N. Yu., Markov A. F., Kandalintseva N. V., Prosenko A. E., Grigoriev I. A. 2007. Synthesis and antioxidant properties of sodium S-[3-(hydroxyaryl)propyl] thio-sulphates and [3-(hydroxyaryl)propane]-1-sulfonates. Izvestiya RAS. Ser. khim. (Russian). 6 : 1094—1101.)

Турпаев К. Т. 2013. Сигнальная система Keap1-Nrf2. Механизм регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений. Биохимия. 78 (2) : 147—166. (Turpaev K. T. 2013. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. Biochemistry (Moscow). 78 (2) : 111—126.)

Chikara S., Nagaprashantha L. D., Singhal J., Horne D., Awasthi S., Singhal S. S. 2018. Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment. Cancer Lett. 413 : 122—134.

Chu X. Y., Liu Y. M., Zhang H. Y. 2017. Activating or inhibiting Nrf2? Trends Pharmacol. Sci. 38 : 953—955.

Dinkova-Kostova A. T., Fahey J. W., Kostov R. V., Kensler T. W. 2017. KEAP1 and NRF2: Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane. Trends Food Sci. Technol. 69 : 257—269.

Fedorova M., Bollineni R. C., Hoffmann R. 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. Mass Spectrom. Rev. 33 : 79—97.

Gazaryan I. G., Thomas B. 2016. The status of Nrf2-based therapeutics: current perspectives and future prospects. Neural Regen. Res. 11 : 1708—1711.

Giordano S., Darley-Usmar V., Zhang J. 2014. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. Redox Biol. 2 : 82—90.

Kapuy O., Papp D., Vellai T., Banhegyi G., Korcsmaros T. 2018. Systems-level feedbacks of NRF2 controlling autophagy upon oxidative stress response. Antioxidants (Basel). 7 (3) : E39.

Kitamura H., Motohashi H. 2018. NRF2 addiction in cancer cells. Cancer Sci. 109 : 900—911.

Klimaszewska-Wisniewska A., Halas-Wisniewska M., Tadrowski T., Gagat M., Grzanka D., Grzanka A. 2016. Paclitaxel and the dietary flavonoid fisetin: a synergistic combination that induces mitotic catastrophe and autophagic cell death in A549 non-small cell lung cancer cells. Cancer Cell Int. 16 : 1—23.

Klionsky D. J., Abdelmohsen K., Abe A., Abidin M. J. et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 12 : 1—222.

Lee Y. J., Lee G. J., Yi S. S., Heo S. H., Park C. R., Nam H. S., Cho M. K., Lee S. H. 2016. Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. Food Chem. Toxicol. 97 : 96—107.

Nabavi S. F., Sureda A., Dehpour A. R., Shirooie S., Silva A. S., Devi K. P., Ahmed T., Ishaq N., Hashim R., Sobarzo-Sanchez E., Daglia M., Braidy N., Volpicella M., Vacca R. A., Nabavi S. M. 2017. Regulation of autophagy by polyphenols: paving the road for treatment of neurodegeneration. Biotechnol. Adv. 2017. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.001.

Niki E. 2016. Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress? Arch. Biochem. Biophys. 595 : 19—24.

Pajares M., Cuadrado A., Rojo A. I. 2017. Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. Redox Biol. 11 : 543—553.

Rajagopal C., Lankadasari M. B., Aranjani J. M., Harikumar K. B. 2018. Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: a novel approach for cancer therapy. Pharmacol. Res. 130 : 273—291.

Shabalala S., Muller C. J. F., Louw J., Johnson R. 2017. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. Life Sci. 180 : 160—170.

Sies H., Berndt C., Jones D. P. 2017. Oxidative stress. Annu. Rev. Biochem. 86 : 715—748.

Wang W., Chen D., Zhu K. 2018. SOX2OT variant 7 contributes to the synergistic interaction between EGCG and Doxorubicin to kill osteosarcoma via autophagy and stemness inhibition. J. Exp. Clin. Cancer Res. 37 : 37.

Zhao Y., Song W., Wang Z., Jin X., Xu J., Bai L., Li Y., Cui J., Cai L. 2018. Resveratrol attenuates testicular apoptosis in type 1 diabetic mice: role of Akt-mediated Nrf2 activation and p62-dependent Keap1 degradation. Redox Biol. 14 : 609—617.

Поступила 26 VI 2018

ACTIVATION OF AUTOPHAGY AND OF Nrf2-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY IN HUMAN BREAST ADENOCARCINOMA CELL LINE MCF-7 BY NOVEL MONOPHENOLIC ANTIOXIDANTS

E. B. Menshchikova,^{1,*} A. V. Chechushkov,¹ P. M. Kozhin,¹ S. V. Kholshin,²
N. V. Kandalintseva,² G. G. Martinovich,³ N. K. Zenkov¹

¹ Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117,

² Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, 630126, and

³ Belarusian State University, Minsk, 220030;

* e-mail lemen@centercem.ru

In order to find new drugs for neoplastic prevention and adjunct to anti-cancer treatment, we have studied the effect of novel water-soluble structurally related monophenolic compounds on the activity of two most important mechanisms of maintaining intracellular homeostasis, such as autophagy and the redox-sensitive signal system Keap1/Nrf2/ARE, in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. The investigation was performed using confocal microscopy. When studying the effect of synthesized compounds on autophagy, a change in the content of intracellular LC3B-positive vesicles (autophagosomes) was analyzed and the ability of the compounds to activate the Keap1/Nrf2/ARE system was determined by their effect on the translocation factor Nrf2 into the nucleus. The influence of tested substances on the rate of autophagosome biogenesis varied depending on their structure and concentration. When inhibitor of autophagosome-lysosomal fusion, chloroquine had been added in culture medium, asymmetrically hindered by *tert*-butyl-group phenols with thiosulfonate (TS-13) and sulfonate group in the *para*-propyl substituent (20 μM) increased the rate of autophagosome elimination in MCF-7 cells, and the shortening of the *para*-alkyl substituent by one methylene unit abolished the effect. But the addition of the second ortho-*tert*-butyl substituent restored it. Of the two tested compounds, both enhanced

the translocation of the transcription factor Nrf2 into the nucleus of MCF-7 cells (the key point to activation of the Keap1/Nrf2/ARE system): phenol asymmetrically hindered by *tert*-butyl-group and having selenosulfonate group in *para*-propyl substituent after 4 hours of incubation (5—100 μ M), TS-13 — after 24 hours of incubation (5—100 μ M). Based on our data earlier provided on the toxicity features of this group of compounds in relation to MCF-7 cells, we can conclude that they are related to the difference in the effect of substances on autophagy and the activation of the signal system of the antioxidant-responsive element Keap1/Nrf2/ARE.

Key words: MCF-7 cell line, Keap1/Nrf2/ARE system, nuclear/cytoplasmic ratio, autophagosome, LC3B, chloroquine, synthetic monophenols, hindering
