

УДК 577.3'32/36

Г. Г. МАРТИНОВИЧ¹, И. В. МАРТИНОВИЧ¹, Е. Б. МЕНЬЩИКОВА²,
Н. К. ЗЕНКОВ², академик С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ¹

РЕДОКС-СВОЙСТВА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ ДЕЙСТВИИ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

¹Белорусский государственный университет, Минск

²НИИ экспериментальной и клинической медицины СО РАМН, Новосибирск, Россия

Поступило 06.04.2015

Введение. Важная роль редокс-процессов для поддержания жизнедеятельности клеток и необходимость изучения данных процессов для понимания патогенеза и коррекции многих функциональных нарушений, реализуемых при окислительном стрессе, обуславливает актуальность их изучения на протяжении многих лет [1; 2]. Показано, что эндогенные (пероксид водорода, глутатион, аскорбиновая кислота и др.) и экзогенные (антиоксиданты, прооксиданты и др.) редокс-активные соединения участвуют в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая регенеративные и адаптационные процессы, иммунный ответ, дифференцировку стволовых клеток, пролиферацию и апоптоз [3; 4]. С другой стороны, увеличение концентрации окислителей при нарушении редокс-гомеостаза играет важную роль в процессах старения организма и развитии различных заболеваний, включая онкологические [1]. Поэтому фармакологические препараты, способные регулировать клеточные редокс-процессы, используются в сердечно-сосудистой, противоопухолевой и противовирусной терапии [5]. Несмотря на обилие литературных данных, посвященных изучению действия редокс-активных соединений в биологических системах, вопрос о механизмах регуляции редокс-гомеостаза остается открытым, что является существенным препятствием для разработки новых лекарственных препаратов антиоксидантного и прооксидантного действия. На необходимость поиска и изучения механизмов регуляции редокс-гомеостаза указывает и тот факт, что природные и синтетические антиоксиданты, использование которых ориентировано на ингибирование известных окислительных процессов, часто не обладают ожидаемой клинической эффективностью при лечении и профилактике заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют окислители.

Внутриклеточные электрон-транспортные процессы, протекающие с участием редокс-активных соединений, рассматриваются как один из способов передачи информации в клетках [3; 4]. В отличие от вторичных мессенджеров, участвующих во внутриклеточной передаче информационных сигналов, редокс-активные соединения функционируют как мессенджеры, переносящие электроны, или редокс-мессенджеры [4; 6]. Поскольку направленность переноса электронов обусловлена физико-химическими характеристиками участников редокс-процессов, трансдукция сигнала с участием редокс-мессенджеров может модулироваться изменением величин различных физико-химических параметров, включая параметры редокс-гомеостаза. Количественными характеристиками редокс-гомеостаза, обусловленного сопряженным функционированием транспортных белков, оксидоредуктаз и низкомолекулярных редокс-активных соединений, являются введенные нами параметры – эффективный редокс-потенциал ($E^{\text{эфф}}$) [7] и редокс-буферная емкость (r) [8]. Однако роль величин физико-химических параметров редокс-гомеостаза в реализации определенного отклика опухолевых клеток на действие редокс-активных соединений экспериментально не обоснована.

Ранее нами было обнаружено, что водорастворимый фенольный антиоксидант 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилиосульфат натрия (ТС-13), индуктор сигнальной системы

Kear1/Nrf2/ARE, вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь [9]. В настоящем исследовании изучено действие водорастворимых фенольных антиоксидантов ТС-13 и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанат калия (БЭК-11-К) на редокс-свойства опухолевых клеток, количественно характеризуемые $E^{\text{эфф}}$ и r , а также изучена роль внутриклеточного редокс-состояния в опосредовании эффектов указанных антиоксидантов на пролиферативную активность опухолевых клеток.

Материалы и методы исследования. Водорастворимые фенольные антиоксиданты ТС-13 и БЭК-11-К (рис. 1), любезно предоставленные проф. Н. В. Кандалицевой, синтезированы в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия) как описано ранее [10]. В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии НЕР-2, которые культивировали в среде MEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 8–10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. При определении влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение добавляли в чашки Петри через 24 ч после пересева клеток. Подсчет клеток проводили на 4-е сутки культивирования. Для получения суспензии клетки снимали раствором трипсин–версен в соотношении 1 : 1 на 6–7-е сутки.

Оценку внутриклеточной продукции активных форм кислорода (АФК) проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H₂DCF) эндогенными окислителями [11]. Значения параметров внутриклеточного редокс-состояния клеток определяли путем редокс-титрования на основе анализа скорости окисления H₂DCF вводимым в систему пероксидом водорода [8; 12]. Параметры $E^{\text{эфф}}$ и r характеризуют стационарное редокс-состояние в клетках. Добавление окислителя ($c_{\text{ок}}$) к клеткам вызывает переход из одного стационарного состояния в другое. Новое стационарное состояние характеризуется величиной $E^{\text{эфф}} = E_0^{\text{эфф}} + \Delta E^{\text{эфф}}$. Зависимость $\Delta E^{\text{эфф}}$ от концентрации введенного в систему окислителя в двойных обратных координатах описывается уравнением прямой с наклоном $r = k_{\text{ем}} / \Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$ и пересечениями: по оси ординат в точке $1 / \Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$ и по оси абсцисс в точке $-1 / k_{\text{ем}}$ [12]:

$$\frac{1}{\Delta E^{\text{эфф}}} = \frac{1}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} + \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} \frac{1}{c_{\text{ок}}},$$

где

$$k_{\text{ем}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i z_i}{z_{\text{ок}}};$$

$\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}} = E_{\text{ок}}^{0'} - E_0^{\text{эфф}}$ – максимальное изменение величины эффективного редокс-потенциала, возможное при условии $c_{\text{ок}} \gg c_{\text{вос}}$; $z_{\text{ок}}$ – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму; c_i – концентрация i -го редокс-активного соединения

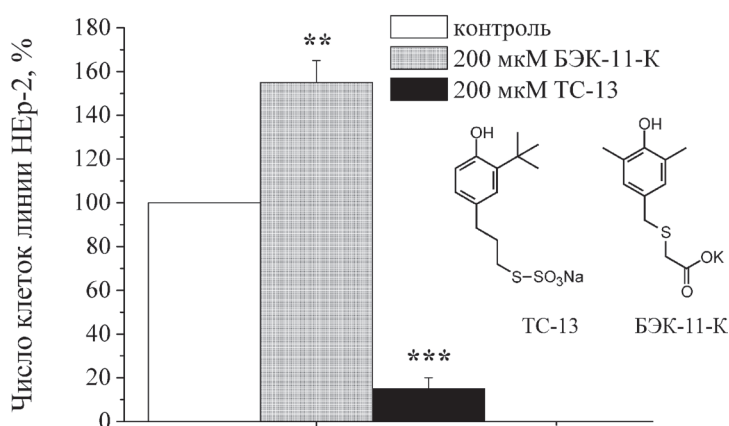


Рис. 1. Изменение числа клеток линии НЕР-2 при культивировании с антиоксидантами ТС-13 и БЭК-11-К. ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем

в биологической жидкости; z_i – число электронов, которые присоединяет молекула окисленной формы вещества, переходя в восстановленную форму; n – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния; $E_{ок}^{0'}$ – редокс-потенциал окислителя при pH 7,0. Константа $k_{ем}$ имеет размерность концентрации и численно равна концентрации окислителя, при которой изменение величины эффективного редокс-потенциала составляет половину своего максимального значения.

В основе метода использована экспериментально и теоретически обоснованная зависимость между величиной индуцированного увеличением концентрации окислителей изменения $E^{эфф}$ и скоростью окисления H_2DCF ($V_{ф}$) [12]

$$V_{ф} = k_0 \Delta E^{эфф}. \quad (1)$$

Согласно (1), скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF пропорциональна величине изменения эффективного редокс-потенциала, поэтому r и $E^{эфф}$ определяются при анализе построенной на основании экспериментальных исследований зависимости $V_{ф}$ от $c_{ок}$.

Измерения проводили при температуре 37 °С в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1,3 мМ, MgSO₄ – 1,3 мМ, KH₂PO₄ – 0,4 мМ, Hерес – 20 мМ, глюкоза – 6 мМ, pH 7,4. Загрузку клеток диацетатом H_2DCF (H_2DCF -DA, Sigma-Aldrich) проводили при температуре 37 °С в СБСР, инкубируя с 10 мкМ зонда в течение 45 мин. Интенсивность флуоресценции DCF, образующегося при окислении H_2DCF , измеряли с использованием спектрофлуориметра CM 2203 научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь). Длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны испускания – 530 нм. Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для 3–5 независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при внесении в культуру клеток карциномы гортани человека линии НЕР-2 антиоксидант БЭК-11-К стимулирует их рост, тогда как ТС-13, напротив, снижает. На рис. 1 показано изменение числа опухолевых клеток при культивировании с антиоксидантами ТС-13 и БЭК-11-К. Внесение БЭК-11-К в концентрации 200 мкМ вызывало увеличение числа клеток в культуре на $55 \pm 10 \%$ в сравнении с контролем. Число выживших клеток при их культивировании с ТС-13 в той же концентрации составляло $15 \pm 5 \%$. При этом начальный отклик внутриклеточных редокс-систем на введение данных антиоксидантов различается. На рис. 2 представлены зависимости скорости изменения интенсивности флуоресценции DCF при внесении в суспензию клеток ТС-13 и БЭК-11-К в концентрациях 200 мкМ. При добавлении антиоксиданта ТС-13 скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF сначала увеличивается, а затем снижается. При добавлении БЭК-11-К – сразу снижается.

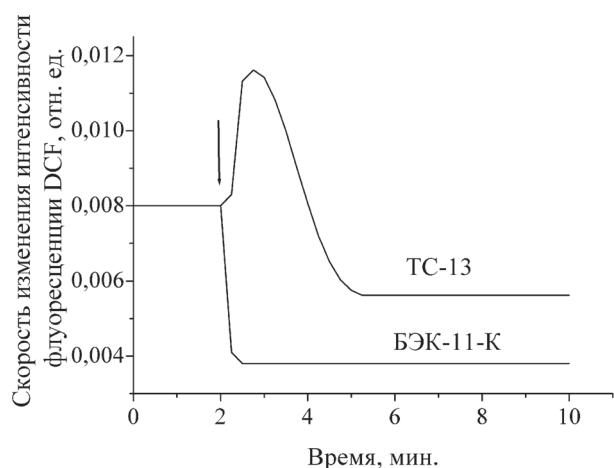


Рис. 2. Влияние антиоксидантов на продукцию АФК в клетках линии НЕР-2. Концентрация антиоксидантов в суспензии клеток – 200 мкМ

Таким образом, при действии антиоксиданта ТС-13 наблюдается кратковременное повышение внутриклеточной продукции АФК в опухолевых клетках.

Ранее нами было показано, что ингибитор открытия пор высокой проводимости циклоспорин А полностью блокирует токсическое действие агента [9]. По-видимому, ТС-13 в результате прямого или опосредованного АФК окисления сульфгидрильных групп аденин-нуклеотидного транспортера индуцирует открытие пор высокой проводимости и запуск программы митохондриально-опосредованного

апоптоза. Открытие пор высокой проводимости, в свою очередь, приводит к уменьшению продукции АФК митохондриями, что вызывает снижение скорости окисления H_2DCF .

При длительном инкубировании клеток с фенольными антиоксидантами снижение внутриклеточной продукции АФК опухолевыми клетками наблюдается при действии обоих соединений. В свою очередь, изменение величин параметров редокс-гомеостаза при культивировании клеток с указанными антиоксидантами существенно различается. На рис. 3, *a* показаны зависимости величины флуоресцентного индекса $V_{\text{ф}}$ от концентрации окислителя в двойных обратных координатах для опухолевых клеток в контроле и при их культивировании с антиоксидантами БЭК-11-К и ТС-13. Определенные с использованием экспериментальных данных величины редокс-буферной емкости и изменения эффективного редокс-потенциала представлены на рис. 3, *б* и рис. 3, *в*.

Редокс-буферная емкость клеток при культивировании с БЭК-11-К в концентрации 200 мкМ увеличивается на $51 \pm 9 \%$, а при культивировании клеток с ТС-13 в концентрации 50 мкМ – уменьшается на $49 \pm 9 \%$. В свою очередь, величина эффективного редокс-потенциала не изменяется при культивировании клеток линии НЕР-2 с антиоксидантом БЭК-11-К, а при культивировании с ТС-13 – повышается. Таким образом, в клетках линии НЕР-2 при культивировании с ТС-13 в сравнении с клетками в контрольной культуре наблюдается усиление внутриклеточных окислительных процессов, что приводит к уменьшению величины редокс-буферной емкости и повышению значения эффективного редокс-потенциала. Поскольку концентрация добавляемых антиоксидантов значительно ниже, чем эндогенных антиоксидантов, то наблюдаемые изменения редокс-свойств клеток, очевидно, обусловлены активацией специфических редокс-сигнальных механизмов.

Одним из механизмов ответа клеток на действие ряда факторов, включая противоопухолевые препараты, является генерация АФК митохондриями. Преобразование внутриклеточного сигнала митохондриями включает три этапа. На первом этапе осуществляется рецепция и преобразование внутриклеточного сигнала, в результате которого усиливается генерация АФК митохондриями. Ранее нами показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигналикации клеток включает усиление локальной продукции АФК в клетках за счет участия специфических оксидоредуктаз – НАДН : убихинон-оксидоредуктазы (Е.С. 1.6.5.3) и убихинол : цитохром с-оксидоредуктазы (Е.С. 1.10.2.2) [13]. На втором этапе с участием АФК осуществляется транс-

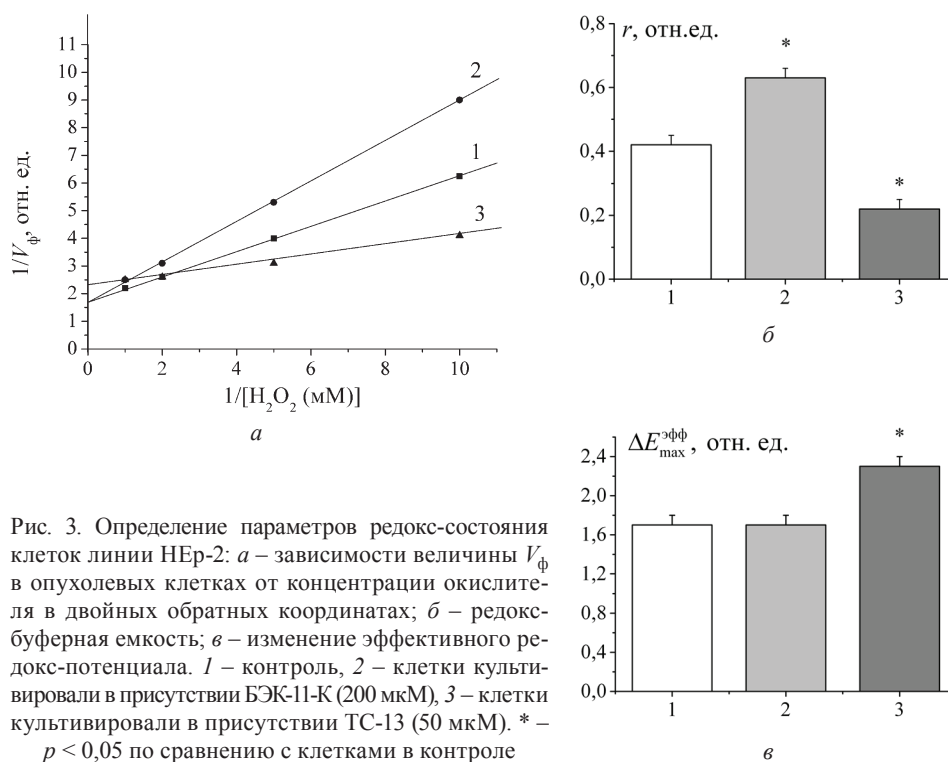


Рис. 3. Определение параметров редокс-состояния клеток линии НЕР-2: *a* – зависимости величины $V_{\text{ф}}$ в опухолевых клетках от концентрации окислителя в двойных обратных координатах; *б* – редокс-буферная емкость; *в* – изменение эффективного редокс-потенциала. 1 – контроль, 2 – клетки культивировали в присутствии БЭК-11-К (200 мкМ), 3 – клетки культивировали в присутствии ТС-13 (50 мкМ). * – $p < 0,05$ по сравнению с клетками в контроле

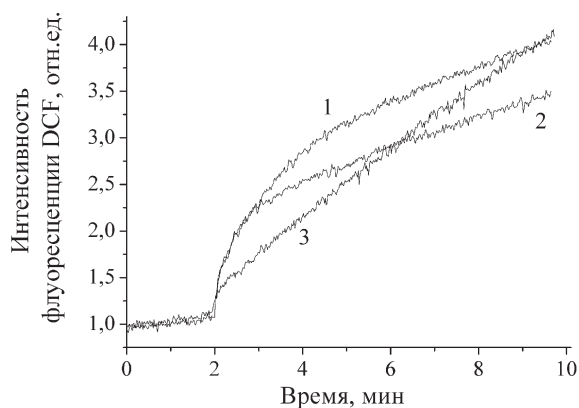


Рис. 4. Влияние H_2O_2 (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции DCF в суспензии клеток линии Нер-2: 1 – контроль; 2 – клетки культивировали в присутствии БЭК-11-К (200 мкМ); 3 – клетки культивировали в присутствии ТС-13 (50 мкМ)

вации апоптоза при действии эндогенных и экзогенных факторов, увеличение редокс-буферной емкости – повышает. Таким образом, в результате изменения редокс-состояния отклик клеток при действии редокс-активных соединений также изменяется.

В модельных условиях в клетках функции сенсора изменений внутриклеточного редокс-состояния выполняет также флуоресцентный зонд H_2DCF . Кинетика интенсивности флуоресценции DCF, образующегося после добавления пероксида водорода, существенно различается в клетках, культивируемых с антиоксидантами БЭК-11-К, ТС-13 и без них (рис. 4). Уменьшение величины редокс-буферной емкости и повышение значения эффективного редокс-потенциала, наблюдаемые в клетках, культивируемых с антиоксидантом ТС-13, приводят к увеличению скорости окисления зонда H_2DCF . Введение антиоксиданта БЭК-11-К в культуру опухолевых клеток запускает компенсаторный адаптационный ответ, в результате которого изменяется внутриклеточное содержание редокс-активных соединений, в первую очередь, восстановителей. В клетках линии Нер-2, культивируемых с антиоксидантом БЭК-11-К, рост концентрации восстановителей в сравнении с немодифицированными клетками приводит к снижению количества окисляемого пероксидом водорода зонда, что отражается в уменьшении интенсивности флуоресценции DCF, образующегося в клетках при окислении H_2DCF пероксидом водорода.

Аналогичный эффект наблюдается и при трансдукции сигнала в клетках с участием АФК. Увеличение содержания восстановителей в клетке вызывает снижение уровня АФК, взаимодействующих с белком-мишенью, в результате изменяется функциональный отклик клеток. Нами показано, что при изменении функционального состояния клеток, индуцированного БЭК-11-К, наблюдается увеличение их резистентности к ТС-13: в культуре клеток, модифицированных БЭК-11-К, количество выживших при действии ТС-13 клеток было в 2 раза выше. В свою очередь, добавление БЭК-11-К в культуру клеток Нер-2 с высокой буферной емкостью не приводило к увеличению их роста.

Таким образом, фенольные антиоксиданты могут участвовать в регуляции редокс-гомеостаза через активацию различных сигнальных механизмов, вызывая как увеличение, так и снижение роста опухолевых клеток в культуре. Одними из основных факторов, определяющих специфичность отклика опухолевых клеток на действие редокс-активных соединений, являются параметры внутриклеточного редокс-состояния – эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость.

Литература

1. *Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З.* и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008. – 284 с.
2. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Минск, 2008. – 159 с.
3. *Jones D. P.* // *J. of Internal Medicine.* 2010. Vol. 268, N 5. P. 432–448.

4. Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г., Мартинович И. В. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 1. С. 92–108.
5. Wondrak G. T. // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 3013–3069.
6. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н. // *Биофизика.* 2011. Т. 56, № 3. С. 465–474.
7. Martinovich G. G., Cherenkevich S. N., Sauer H. // *Eur. Biophys. J.* 2005. Vol. 34, N 7. P. 937–942.
8. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N., Sauer H. // *Cell Biochem. Biophys.* 2010. Vol. 58, N 2. P. 75–83.
9. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Зенков Н. К. и др. // *Биофизика.* 2015. Т. 60, № 1. С. 120–128.
10. Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Кандалицева Н. В. и др. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. С. 790–798
11. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н. // *Биомед. химия.* 2005. Т. 5, № 6. С. 626–633.
12. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н. // *Биофизика.* 2008. Т. 53, № 4. С. 618–623.
13. Martinovich G. G., Golubeva E. N., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N. // *J. of Biophysics.* Vol. 2012. Article ID 921653. – 6 p.
14. Tsujimoto Y., Nakagawa T., Shimizu S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1757. P. 1297–1300.

G. G. MARTINOVICH, I. V. MARTINOVICH, E. B. MENSCHIKOVA, N. K. ZENKOV,
S. N. CHERENKEVICH

martinovichgg@bsu.by

REDOX PROPERTIES OF TUMOR CELLS AND THEIR PROLIFERATIVE ACTIVITY UNDER THE ACTION OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS

Summary

It was established that the response of tumor cells to the action of the redox-active compound is regulated by the intracellular redox state quantitatively characterized by the effective redox potential and the redox buffer capacity. Phenolic antioxidant 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl thioetanoate (BEP-11-K) was found to stimulate the proliferation in culture and an increase of the redox buffer capacity. Phenolic antioxidant 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-13) inhibits the growth of tumor cells in culture. The action of TS-13 results in a decrease of the redox buffer capacity and an increase of the effective redox potential. The toxic effect of TC-13 is reduced by an increase of the cellular redox buffer capacity.