

ИНДУКТОР ЭКСПРЕССИИ ARE-РЕГУЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ ФЕНОЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ ТС-13 ВЫЗЫВАЕТ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕРЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНО-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ПУТЬ

© 2015 г. Г.Г. Маргинович, И.В. Маргинович, Н.К. Зенков*, Е.Б. Меньщикова*,
Н.В. Кандалинцева**, С.Н. Черенкевич

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь;

E-mail: martinovichgg@bsu.by

*Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2;

E-mail: lemen@centercem.ru

**Новосибирский государственный педагогический университет, 630126, Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

E-mail: aquaphenol@mail.ru

Поступила в редакцию

Исследовано влияние водорастворимых фенольных антиоксидантов 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфата натрия (ТС-13), 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтаната калия (БЭК-11-К) и 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропионата калия (фенозан-калий) на пролиферативную активность опухолевых клеток и роль редокс-зависимых и кальций-зависимых сигнальных механизмов в реализации отклика опухолевых клеток на действие антиоксидантов. Обнаружено, что фенозан-калий и БЭК-11-К стимулировали пролиферацию, а индуктор сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE фенольный антиоксидант ТС-13 ингибировал рост опухолевых клеток в культуре. Скорость роста опухолевых клеток зависела от скорости внутриклеточной продукции активных форм кислорода и снижалась при действии ингибитора НАДФН-оксидазы апоцинина и ингибитора убихинол-цитохром с оксидоредуктазы антимицина А. Действие ТС-13 на опухолевые клетки сопровождалось кратковременным повышением внутриклеточной продукции активных форм кислорода и ростом внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , тогда как инкубация клеток с фенозан-калием и БЭК-11-К не приводила к повышению уровня активных форм кислорода и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Циклоспорин А блокировал ингибирующий эффект ТС-13. Это позволило предположить, что при действии фенольного антиоксиданта ТС-13 в опухолевых клетках через открытие пор высокой проводимости запускается митохондриально-опосредованный апоптоз.

Ключевые слова: рост опухолевых клеток, митохондриально-опосредованный апоптоз, водорастворимые фенольные антиоксиданты, активные формы кислорода.

Поиск и установление новых механизмов регуляции функциональной активности клеток – необходимый этап развития современных биомедицинских технологий. Широко используемыми регуляторами функционирования клеток в нормальных и стрессовых условиях являются природные и синтетические фенольные

антиоксиданты. Несмотря на то, что структурные особенности фенолов, определяющие их антиоксидантные свойства в модельных системах, достаточно хорошо исследованы, взаимосвязь между биологическим действием фенольных препаратов и их антиоксидантными свойствами зачастую не выявляется. Исследования структурно взаимосвязанного ряда бифункциональных фенольных антиоксидантов, содержащих разное количество *орто-трет*-бутильных заместителей, а также сульфонатные и тиосульфонатные группы в *пара*-алкильных заместителях, позволили выявить соединения с выраженными противовоспалительными свойствами *in vivo* [1]. Противовоспалительный эффект серосодержащих фенольных антиоксидантов в ор-

Сокращения: Nrf2 – NF-E2-связанный фактор 2, Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1, ARE – антиоксидант-респонсивный элемент, ТС-13 – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия, АФК – активные формы кислорода, БЭК-11-К – 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанат калия, H_2DCF – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин, DCF – 2',7'-дихлорофлуоресцеин, ANT – адениннуклеотидный транспортер, Klf9 – Krippel-подобный фактор 9.

ганизме может определяться их действием на редокс-зависимые факторы транскрипции, включая NF-E2-связанный фактор 2 (Nrf2), транскрипционная активность которого регулируется специфическим ингибитором Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1). Фактор Nrf2 регулирует экспрессию более 500 генов, главным образом антиоксидантных ферментов и ферментов детоксикации ксенобиотиков, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность антиоксидант-респонсивного элемента (ARE) [2,3]. Показано, что одним из активных синтетических индукторов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является фенольный антиоксидант 3-(3'-*трем*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия (ТС-13), содержащий тиосульфатную группу с лабильной S-S-связью [1]. Обнаружено защитное действие ТС-13 при остром [4] и хроническом воспалении *in vivo* [5]. Показано также, что ТС-13 увеличивает выживаемость разных линий *Drosophila melanogaster* в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂ и паракватом [6]. При этом в нормальных условиях введение в диету фенольного антиоксиданта ТС-13 повышает продолжительность жизни у самцов и самок долгоживущей линии *D. melanogaster Canton S*, но снижает среднюю продолжительность жизни самцов *D. melanogaster* линии *lgl⁵⁵⁸OR/Cy*, содержащей в гетерозиготном состоянии рецессивную летальную мутацию опухолевого супрессора [6]. Неоднозначность действия антиоксиданта в различных экспериментальных условиях может быть опосредована особенностями клеточного редокс-гомеостаза, который определяет протекание ряда метаболических и регуляторных процессов [7] и может влиять на биологическое действие редокс-активных соединений. Так, например, эпигаллокатехин-3-галлат в высоких концентрациях индуцирует генерацию активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках, но ингибирует образование АФК в нормальных эпителиальных клетках [8].

В настоящее время ведутся интенсивные исследования, направленные на поиск и разработку новых технологий противоопухолевой терапии, задачей которых является регуляция окислительно-восстановительных процессов в клетках [9,10]. Поскольку в качестве ключевых характеристик трансформированных тканей выделяют нарушения клеточного и тканевого редокс-гомеостаза, в таких технологиях предлагается использовать различные редокс-активные соединения, включая фенолы [9,11]. Биологическая активность фенольного антиокси-

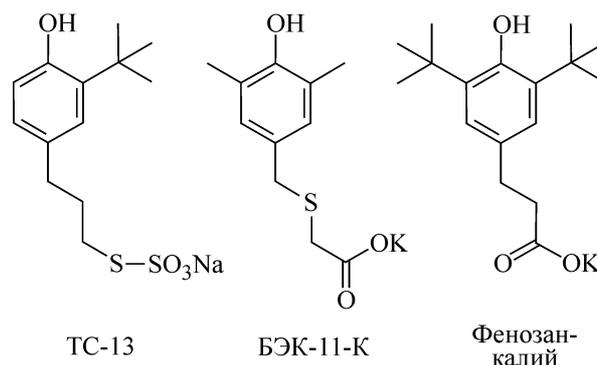


Рис. 1. Структурные формулы фенольных антиоксидантов.

данта ТС-13 в условиях измененного редокс-гомеостаза опухолевых клеток может также существенно модифицироваться. В данной работе нами изучены влияние ТС-13 на пролиферативную активность опухолевых клеток и роль редокс-зависимых и кальций-зависимых сигнальных механизмов в реализации отклика опухолевых клеток на действие ТС-13. Проведен анализ действия ТС-13 в опухолевых клетках в сравнении с другими водорастворимыми фенольными антиоксидантами, такими как серо-содержащий 3,5-диметил-4-гидроксибензилтиоэтанат калия (БЭК-11-К) и не содержащий серы 3-(3',5'-ди-*трем*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропионат калия (фенозан-калий).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Водорастворимые фенольные антиоксиданты ТС-13, БЭК-11-К и фенозан-калий (препарат сравнения) синтезированы в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия), как описано ранее [1] (рис. 1). В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии НЕР-2 и клетки аденокарциномы молочной железы линии МСF-7.

Клетки карциномы гортани человека линии НЕР-2 культивировали в среде MEM («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 8–10% эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки аденокарциномы молочной железы линии МСF-7 культивировали в среде DMEM («Sigma-Aldrich», США). Для определения влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение добавляли в чашки Петри через 24 ч после пересева клеток. Подсчет клеток проводили на четвертые сутки культивирования. Для получения суспензии клетки снимали раствором

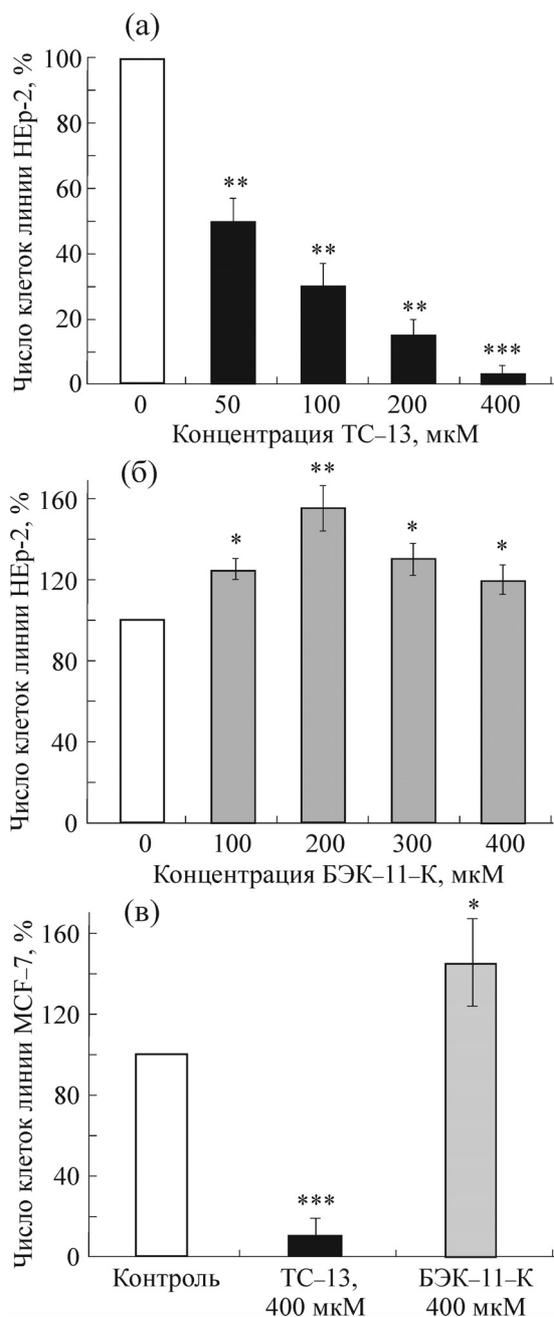


Рис. 2. Изменение числа клеток линий HEp-2 (а, б) и MCF-7 (в) при культивировании с антиоксидантами ТС-13 (а, в) и БАК-11-К (б, в). Здесь и на рис. 3–8: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

трипсин-версен в соотношении 1:1 на шестые–седьмые сутки.

Оценку внутриклеточной продукции АФК проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H_2DCF) [12]. Определяли начальную скорость окисления H_2DCF (V_0),

начальную скорость окисления H_2DCF после добавления антиоксиданта (V_1) и конечную скорость окисления H_2DCF после добавления антиоксиданта (V_2). Измерения проводили при температуре $37^\circ C$ в сбалансированном буферном солевом растворе следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, $CaCl_2$ – 1,3 мМ, $MgSO_4$ – 1,3 мМ, KH_2PO_4 – 0,4 мМ, HEPES – 20 мМ, глюкозы – 6 мМ, pH 7,4. Суспензию клеток нагружали H_2DCF -DA («Sigma-Aldrich», США), инкубируя с 10 мкМ зонда в течение 45 мин при температуре $37^\circ C$ в сбалансированном солевом буфере. Измерение интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося при окислении H_2DCF , проводили при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм. Для определения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{цит}$) клетки нагружали флуоресцентным зондом fura 2-AM («Sigma-Aldrich», США) в течение 45 мин при температуре $37^\circ C$, затем дважды отмывали в сбалансированном солевом буфере. Для деэфиризации зонда клетки инкубировали в течение 15–30 мин при температуре $37^\circ C$. Флуоресцентные сигналы fura 2 регистрировали при длине волны испускания 510 нм и двух длинах волн возбуждения – 340 нм и 380 нм. Расчет внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} проводили по методу Гринкевича [13]. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра CM 2203 научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь).

В работе использовали ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин (1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)этанол), ингибитор убухинол-цитохром *c* оксидоредуктазы антимицин А, ингибитор сборки митохондриальных пор высокой проводимости циклоспорин А (все ингибиторы производства «Sigma-Aldrich», США). Приведенные в работе кинетические зависимости являются типичными для серии из трех–пяти независимых экспериментов. Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для трех–пяти независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что введение антиоксиданта ТС-13 в культуру клеток карциномы гортани человека линии HEp-2 дозозависимо угнетает рост клеток (рис. 2а), концентрация 50% ингибирования IC_{50} , вычисленная из урав-

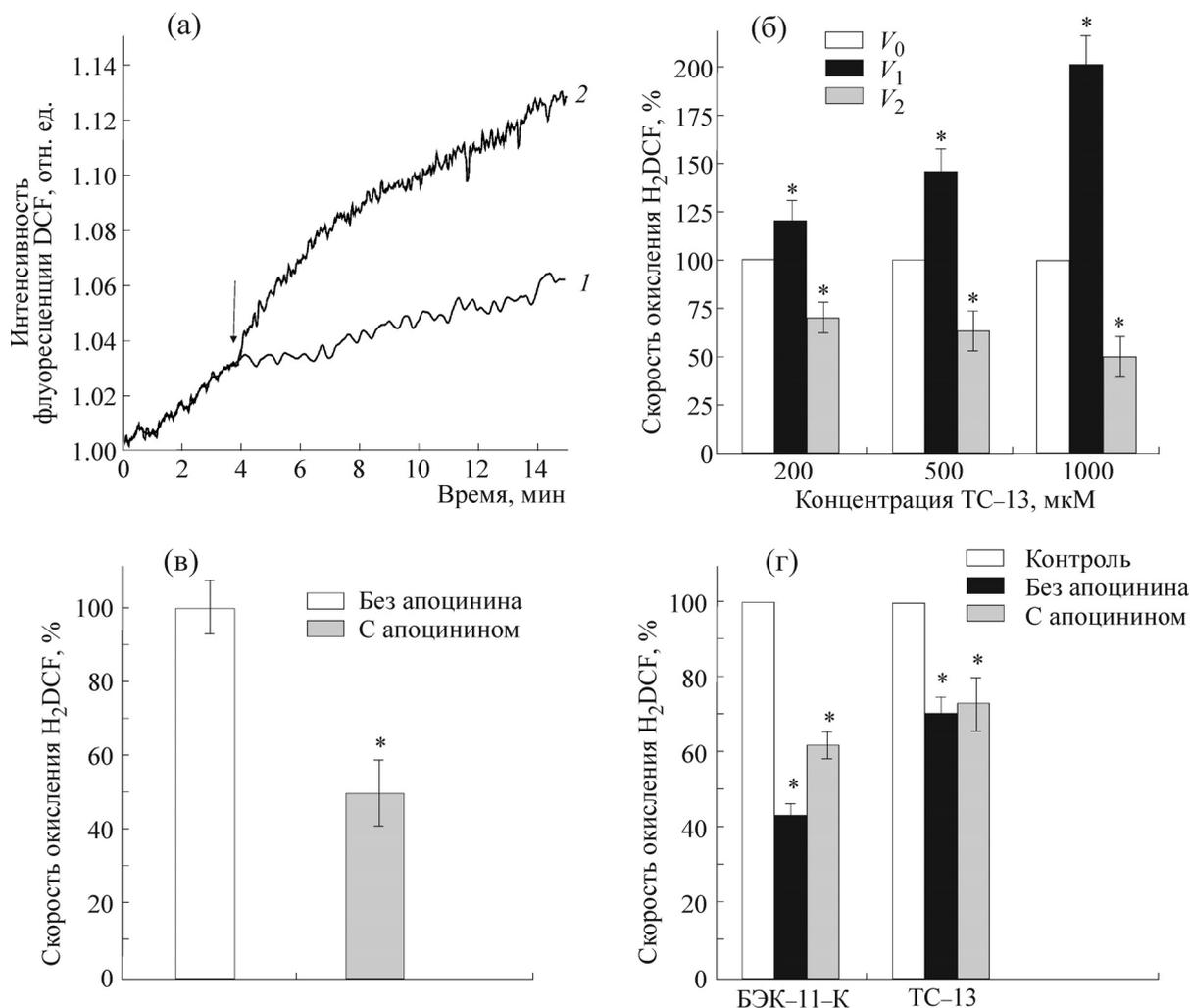


Рис. 3. Влияние антиоксидантов и ингибиторов на продукцию АФК клетками карциномы гортани человека линии HEp-2: (а) – изменение интенсивности флуоресценции DCF в клетках при действии антиоксидантов БЭК-11-К (кривая 1) и ТС-13 (кривая 2), стрелкой обозначен момент добавления соединения; (б) – изменение скорости окисления H₂DCF на первой и второй стадиях редокс-отклика клеток на действие ТС-13; (в) – влияние апоцинина на продукцию АФК клетками; (г) – изменение скорости окисления H₂DCF в клетках при действии антиоксидантов. Концентрации антиоксидантов (а, г) – 200 мкМ.

нения экспоненциальной аппроксимации, составляет 54 мкМ. С другой стороны, добавление антиоксиданта БЭК-11-К в культуру клеток HEp-2 в концентрациях от 100 до 400 мкМ увеличивает рост клеток (рис. 2б). Максимальный эффект наблюдали при культивировании клеток линии HEp-2 с БЭК-11-К в концентрации 200 мкМ, в этом случае их численность увеличивалась на $55 \pm 10\%$ в сравнении с контролем, принятым за 100% ($p < 0,01$, $n = 6$).

Направленные аналогичным образом эффекты наблюдали и при действии данных антиоксидантов в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 (рис. 2в), однако максимальное увеличение скорости роста клеток линии MCF-7 происходило

при концентрации антиоксиданта БЭК-11-К, равной 400 мкМ. Известный водорастворимый синтетический фенольный антиоксидант фенозан-калий, имеющий подобную структуру, усиливал пролиферативную активность опухолевых клеток (так же как и БЭК-11-К), но эффект был менее выраженным (данные не представлены).

При длительном инкубировании опухолевых клеток продукция АФК снижается в присутствии как БЭК-11-К, так и ТС-13 (данные для клеток линии MCF-7 не представлены). Однако начальный отклик внутриклеточных редокс-систем на введение данных антиоксидантов различается (рис. 3): если антиоксидант БЭК-11-К однозначно уменьшает внутриклеточ-

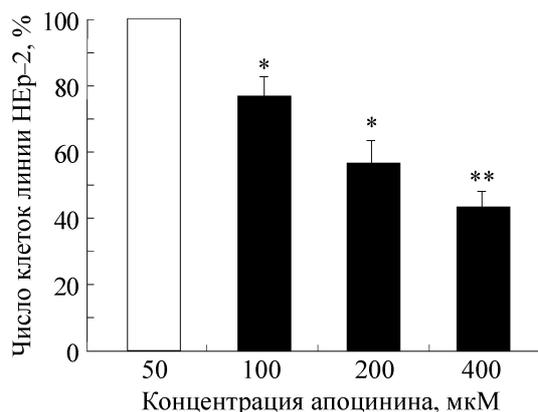


Рис. 4. Изменение числа клеток линии HEp-2 при культивировании с апоцинином.

ную продукцию АФК, приводящую к образованию DCF в результате окисления H_2DCF , то под действием антиоксиданта ТС-13 скорость окисления H_2DCF сначала увеличивается, а затем снижается (рис. 3а). То есть в отклике редокс-систем клеток на действие ТС-13 можно выделить две стадии, каждая из которых характеризуется своей скоростью продукции АФК. На первой стадии наблюдается кратковременное увеличение продукции АФК, скорость которой (V_1) растет при повышении концентрации ТС-13 (рис. 3б). На второй стадии (V_2) отклика редокс-систем клеток на действие ТС-13 продукция АФК уменьшается в сравнении с начальным уровнем (V_0) также дозозависимо. В сравнении с другим серосодержащим фенольным антиоксидантом БЭК-11-К снижение скорости окисления H_2DCF в присутствии ТС-13 было менее выраженным. Так, если добавление БЭК-11-К в концентрации 200 мкМ приводит к снижению скорости окисления H_2DCF на $57 \pm 5\%$ по сравнению с начальной скоростью, то ТС-13 в аналогичной концентрации вызывает снижение скорости окисления H_2DCF на $30 \pm 5\%$ (рис. 3г).

Образование АФК в опухолевых клетках может проходить с участием различных ферментов, включая НАДФН-оксидазу и оксидоредуктазы митохондрий [14]. Для оценки вклада внутриклеточных оксидоредуктаз нами использовался специфический ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин. Предварительная инкубация клеток с апоцинином приводит к снижению выхода АФК по сравнению с контролем (рис. 3в). Таким образом, наряду с митохондриальными белками в продукции АФК опухолевыми клетками участвует также НАДФН-оксидаза. Вероятно, АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, участвуют в регуляции рос-

та клеток, как это показано для ряда клеток животных и растений [15]. Ингибирование сборки НАДФН-оксидазы при действии апоцинина в клетках карциномы гортани человека линии HEp-2 вызывает снижение их роста в культуре (рис. 4), $IC_{50} = 362$ мкМ. Редокс-регуляция клеточных процессов осуществляется с участием электрон-транспортных цепей (редокс-цепей), компонентами которых могут выступать различные редокс-активные соединения [16,17]. Нарушения функционирования данных цепей могут вызывать гибель клеток и индуцируются при действии как прооксидантных, так и антиоксидантных препаратов. Вероятно, исследуемые фенольные антиоксиданты включаются в функционирование различных электрон-транспортных цепей. В исследовании показано, что ингибирование сборки НАДФН-оксидазы апоцинином снижает антиоксидантное действие БЭК-11-К, но не ТС-13 (рис. 3г). Таким образом, БЭК-11-К может участвовать в регуляции электрон-транспортных процессов, протекающих с участием НАДФН-оксидазы и митохондриальных АФК, тогда как ТС-13 является участником электрон-транспортных процессов, опосредованных только митохондриальными оксидоредуктазами. Ранее нами показано, что аскорбиновая кислота инициирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо опухолевых клеток в результате усиления локальной внутриклеточной продукции АФК с участием митохондриальных оксидоредуктаз [18]. Вероятно, ТС-13 также может усиливать образование АФК в митохондриях, о чем свидетельствует кратковременное повышение скорости окисления H_2DCF (рис. 3а). При этом действие антиоксиданта ТС-13 сопровождается возрастанием внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (рис. 5), тогда как инкубация клеток с БЭК-11-К и фенозан-калием не приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_{цит}$.

В проведенном исследовании показано, что усиление эндогенной продукции АФК митохондриями приводит к снижению пролиферативной активности клеток в культуре. При добавлении в суспензию клеток антимицина А, ингибитора убихинол-цитохром с оксидоредуктазы, усиливается внутриклеточная продукция АФК, что приводит к увеличению скорости окисления H_2DCF (рис. 6а). С ростом концентрации антимицина А наблюдается увеличение внутриклеточной продукции АФК. С другой стороны, введение антимицина А в культуру клеток карциномы гортани человека линии HEp-2 дозозависимо снижает число клеток в сравнении с контролем (рис. 6б), $IC_{50} = 1,4$ мкМ.

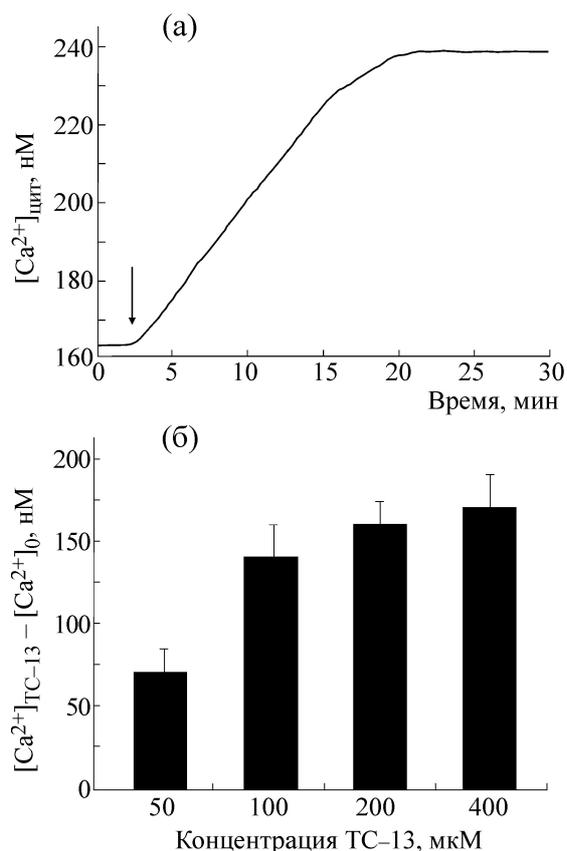


Рис. 5. Влияние антиоксиданта ТС-13 на содержание ионов Ca^{2+} в клетках линии HEp-2: (а) – кинетика изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} после добавления ТС-13; (б) – изменение концентрации ионов Ca^{2+} в клетках линии HEp-2 при инкубировании с антиоксидантом ТС-13. Изменение концентрации ионов Ca^{2+} определяли как разность между внутриклеточной концентрацией ионов Ca^{2+} после инкубирования в течение 20 мин с ТС-13 ($[Ca^{2+}]_{ТС-13}$) и базальным уровнем ионов Ca^{2+} в клетках ($[Ca^{2+}]_0$).

Повышение продукции АФК в митохондриях вызывает окисление сульфгидрильных групп адениннуклеотидного транспортера ANT внутренней мембраны митохондрий, что приводит к образованию поры высокой проводимости в результате формирования комплекса с участием циклофилина D, ANT и потенциал-зависимого анионного канала VDAC внешней мембраны митохондрий [19]. Открытие пор высокой проводимости сопровождается деполяризацией внутренней мембраны митохондрий и приводит к высвобождению цитохрома *c* и апоптоз-индуцирующего фактора AIF, что является начальной стадией апоптоза [20]. В свою очередь, цитохром *c* вызывает длительное повышение цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} , необходимое для формирования апоптосом [21], в результате стабилизации в открытом

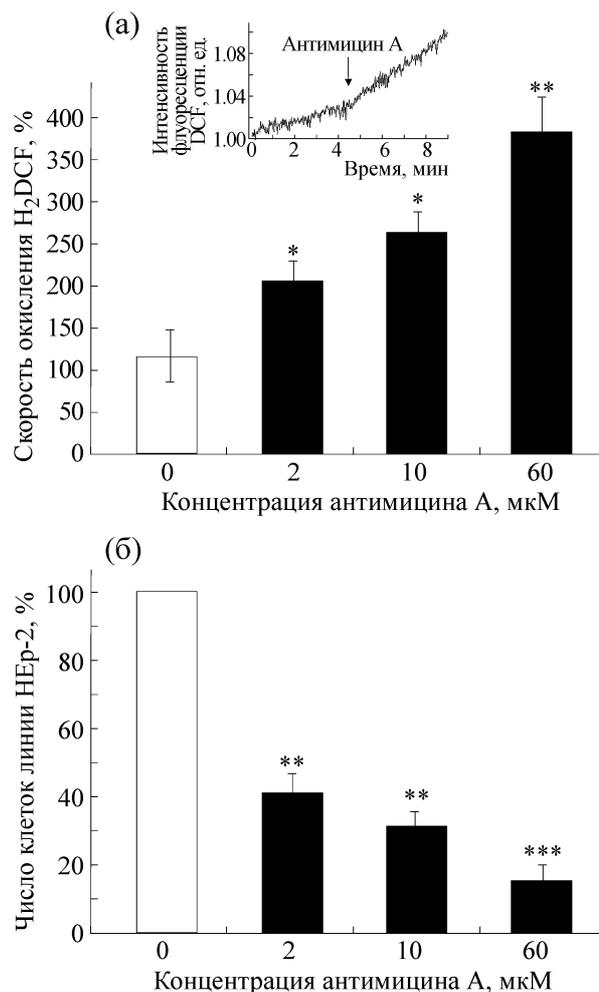


Рис. 6. Влияние антимицина А на внутриклеточную продукцию АФК и скорость роста клеток линии HEp-2: (а) – изменение скорости окисления H_2DCF при действии антимицина А в клетках линии HEp-2; (б) – изменение числа клеток линии HEp-2 при культивировании с антимицином А. На вставке представлена кинетика изменения интенсивности флуоресценции DCF после добавления антимицина А (60 мкМ).

состоянии рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата в эндоплазматическом ретикулуме [22]. Таким образом, при действии ТС-13 может происходить окисление сульфгидрильных групп ANT, что индуцирует открытие пор высокой проводимости и запуск программы митохондриально-опосредованного апоптоза.

Для проверки данного предположения использовался циклоспорин А – ингибитор открытия пор высокой проводимости. Циклоспорин А связывается с циклофилином D, блокируя его ассоциацию с другими белками при формировании поры высокой проводимости [23,24]; в высоких концентрациях может оказывать токсическое действие на клетки. Нами показано,

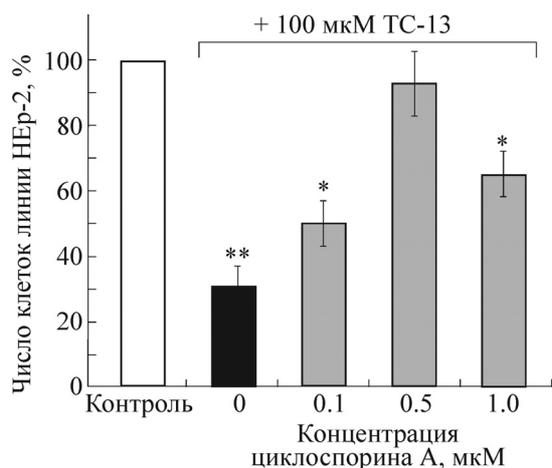


Рис. 7. Изменение числа клеток линии HEp-2 при культивировании с антиоксидантом TC-13 и циклоспорином А.

что введение в культуру опухолевых клеток HEp-2 циклоспорина А в концентрациях до 5 мкМ не влияет на их пролиферативную активность. При введении циклоспорина А в культуру в концентрациях от 0,1 до 1 мкМ наблюдается уменьшение токсического действия фенольного антиоксиданта TC-13 на опухолевые клетки (рис. 7): в концентрации 0,5 мкМ он практически полностью блокирует действие TC-13. Полученные результаты подтверждают, что в опухолевых клетках при действии TC-13 запускается митохондриально-опосредованный апоптоз в результате открытия пор высокой проводимости в мембранах митохондрий.

Имеющиеся данные позволяют предполагать, что возможными внутриклеточными мишенями действия фенольного водорастворимого антиоксиданта TC-13 являются остатки цистеина белка Keap1 и/или белка ANT (рис. 8). В водных растворах с физиологическими значениями pH TC-13 нестабилен и за счет быстро протекающего взаимодействия тиосульфата

с формирующимися на первой стадии его гидролиза тиолятами образуются дисульфиды, кроме того, окисляясь в результате взаимодействия с АФК, антиоксидант TC-13 переходит в хинонную форму, что, как показано для прототипических индукторов ARE, обуславливает ARE-активирующие свойства фенолов [25]. Таким образом, механизм активации соответствующих белков антиоксидантом TC-13 может быть обусловлен, по крайней мере частично, его взаимодействием с сульфгидрильными группами белка Keap1 или и/или белка ANT, приводящим к образованию смешанных дисульфидов. Модификация SH-групп «ключевых» остатков цистеина в Keap1 за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к нарушению убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [2,3]. Образование дисульфидов в адениннуклеотидном транспортёре ANT индуцирует его связывание с порином VDAC и циклофилином D, что приводит к формированию пор высокой проводимости и запуску программируемой гибели клеток [20]. Однако активация конкретной мишени действия TC-13, вероятно, зависит от гомеостаза клеток и различается в нормальных и трансформированных клетках.

Запуск митохондриально-опосредованного апоптоза происходит при действии как одного фактора, так и их комплекса [26]. В результате сниженной активности ферментов дыхательной цепи митохондрий в опухолевых клетках может увеличиваться утечка электронов на кислород с участием семихиноновых радикалов [27]. С другой стороны, повышенная продукция АФК в опухолевых клетках может быть следствием чрезмерной активации сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE. Мутации Keap1, ведущие к нарушению его функционирования, обнаружены в карциномах многих тканей [28,29]. В результате во многих опухолевых тканях и кле-

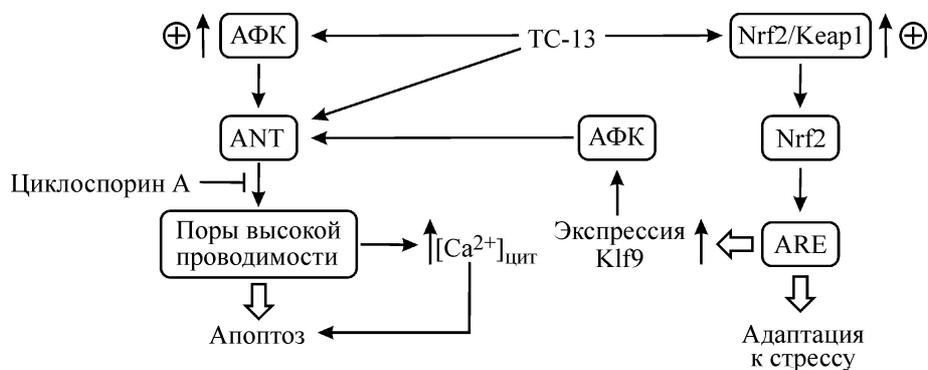


Рис. 8. Сигнальные пути с участием фенольного антиоксиданта TC-13 в опухолевых клетках.

точных линиях опухолей наблюдается конститутивная активация Nrf2 [30], что во многом обуславливает неопределенность и неоднозначность действия экзогенных регуляторов сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE. Недавно было обнаружено, что Nrf2 стимулирует экспрессию фактора транскрипции Klf9 (Kruppel-подобный фактор 9) [31]. В свою очередь, взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК усиливает окислительный стресс путем изменения экспрессии ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК. Вероятно, повышенная продукция АФК опухолевыми клетками в результате нарушения функционирования электрон-транспортной цепи и/или сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE служит фактором, позволяющим преодолеть «порог активации» апоптоза при действии ТС-13 в митохондриях.

В проведенном исследовании обнаружено, что синтетические водорастворимые фенольные антиоксиданты 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия, 3,5-диметил-4-гидроксибензилтиоэтанат калия и 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-пропионат калия являются регуляторами роста опухолевых клеток. Фенозан-калий и БЭК-11-К стимулируют рост опухолевых клеток в культуре, а серосодержащий фенольный антиоксидант ТС-13 запускает митохондриально-опосредованный апоптоз в опухолевых клетках через открытие пор высокой проводимости. Таким образом, выявленное ингибирование роста опухолевых клеток антиоксидантом ТС-13 делает перспективным его дальнейшее исследование в качестве противоопухолевого препарата.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б13-044).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова, Н. В. Кандалинцева и др., Биохимия **72** (6), 790 (2007).
2. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова, В. О. Ткачев, Биохимия **78** (1), 27 (2013).
3. К. Т. Турпаев, Биохимия **78** (2), 147 (2013).
4. Е. Б. Меньщикова, В. О. Ткачев, Н. К. Зенков и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **155** (3), 344 (2013).
5. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, А. Е. Лемза и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **155** (3), 305 (2013).
6. Н. Я. Вайсман, Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков и др., Успехи геронтологии **24** (4), 591 (2011).
7. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, Успехи физиол. наук **39** (3), 29 (2008).
8. T. Yamamoto, S. Hsu, J. Lewis, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. **307** (1), 230 (2003).
9. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Н. Голубева и др., Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук, № 2, 85 (2012).
10. D. Trachootham, J. Alexandre, and P. Huang, Nat. Rev. Drug. Discov. **8** (7), 579 (2009).
11. G. T. Wondrak, Antioxid Redox Signal **11** (12), 3013 (2009).
12. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, Биомед. химия **51** (6), 626 (2005).
13. G. Gryniewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, J. Biol. Chem. **260** (6), 3440 (1985).
14. P. Storz, *Oxidative Stress and Redox Regulation* (Springer Netherlands, 2013).
15. B. Groitl and U. Jakob, Biochim. Biophys. Acta **1844** (8), 1335 (2014).
16. D. P. Jones, Am. J. Physiol. Cell Physiol. **295** (4), C849 (2008).
17. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, Биофизика **56** (3), 465 (2011).
18. G. G. Martinovich, E. N. Golubeva, I. V. Martinovich, et al., J. Biophysics **2012**, ID 921653 (2012).
19. A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield, and C. P. Connern, J. Biol. Chem. **272** (6), 3346 (1997).
20. Y. Tsujimoto, T. Nakagawa, and S. Shimizu, Biochim. Biophys. Acta **1757** (9–10), 1297 (2006).
21. C. Cerella, M. Diederich, and L. Ghibelli, Int. J. Cell Biol. **2010**, 546163 (2010).
22. D. Boehning, R.L. Patterson, L. Sedaghat, et al., Nat. Cell Biol. **5** (12), 1051 (2003).
23. D.H. Walter, J. Haendeler, J. Galle, et al., Circulation **98** (12), 1153 (1998).
24. K. G. Norman, J. A. Canter, M. Shi, et al., Mitochondrion **10** (2), 94 (2010).
25. X. J. Wang, J. D. Hayes, L. G. Higgins, et al., Chem. Biol. **17** (1), 75 (2010).
26. L. A. Sena and N. S. Chandel, Mol. Cell **48** (2), 158 (2012).
27. M. L. Boland, A. H. Chourasia, and K. F. Macleod, Front. Oncol. **3**, ID 292 (2013).
28. T. Ohta, K. Iijima, M. Miyamoto, et al., Cancer Res. **68** (5), 1303 (2008).
29. L. M. Solis, C. Behrens, W. Dong, et al., Clin. Cancer Res. **16** (14), 3743 (2010).
30. M. C. Jaramillo and D.D. Zhang, Genes and Development **27** (20), 2179 (2013).
31. S. N. Zucker, Emily E. Fink, A. Bagati, et al., Mol. Cell **53** (6), 916 (2014).

Phenolic Antioxidant TS-13 Regulating ARE-dependent Genes Induces Tumor Cell Death by Mitochondria-dependent Pathway

G.G. Martinovich*, I.V. Martinovich*, N.K. Zenkov**, E.B. Menshchikova**,
N.V. Kandalintseva***, and S.N. Cherenkevich*

*Belarusian State University, ul. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Republic of Belarus

**Scientific Center of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

***Novosibirsk State Pedagogical University, ul. Vilyuiskaya 28, Novosibirsk, 630126 Russia

Effects of water-soluble phenolic antioxidant sodium 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)-propyl thio-sulfonate (TS-13), potassium 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl thioetanoate (BEP-11-K) and potassium 3-(3',5'-ditertbutyl-4'-hydroxyphenyl)-propionate (potassium phenosan) on tumor cells proliferative activity and the role of redox-dependent and calcium-dependent signaling mechanisms in realization of tumor cell response to the antioxidant action were studied. Potassium phenosan and BEP-11-K were found to stimulate proliferation and ARE-inducing phenolic antioxidant TS-13 was found to inhibit tumor cell growth in culture. The tumor cell growth rate depended on the rate of intracellular reactive oxygen species production and was decreased by apocynin (a NADPH-oxidase inhibitor) and antimycin A (an ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase inhibitor). TS-13 action on tumor cells was accompanied by a transient increase in intracellular reactive oxygen species production and the intracellular calcium concentration, whereas cell incubation with potassium phenosan and BEP-11-K did not influence the reactive oxygen species level and intracellular calcium ions. Cyclosporine A blocked the inhibitory effect of TS-13. Thus, it can be reasonably speculated that phenolic antioxidant TS-13 starts mitochondria-dependent apoptosis in tumor cells by the opening of permeability transition pores.

Key words: tumor cell growth, mitochondria-dependent apoptosis, water-soluble phenolic antioxidants, reactive oxygen species