

ЭКСПОЗИЦИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНФЕНА НАТРИЯ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2020 г. Е. М. Миль¹*, В. И. Бинюков¹, В. Н. Ерохин¹, А. А. Албантова¹,
А. А. Володькин¹, А. Н. Голошапов¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: elenamil2004@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2020 г.

После доработки 08.04.2020 г.

Принята к публикации 09.04.2020 г.

Исследовано апоптотическое действие антиоксиданта анфена натрия, пространственно затрудненного фенола, который обладает противоопухолевой активностью, в частности, тормозит развитие опухолевых клеток саркомы 37. Обнаружено, что введение анфена натрия (10^{-4} М) в культуру клеток карциномы Льюис мышей уже через 1–1.5 ч приводило к экспозиции фосфатидилсерина и началу процесса апоптоза в клетках (по флуоресценции аннексина V-FITC). При совместном действии H_2O_2 (5 мкМ) и анфена натрия увеличивалась проницаемость клеток для акридинового оранжевого, а также возрастало до 80–100% число апоптотических клеток. При этом в опухолевых клетках наблюдали образование как единичных, так и многочисленных апоптотических телец внутри клетки. В этих же условиях в клетках селезенки (спленоцитах) здоровых мышей было обнаружено меньшее число апоптотических клеток (14–16%), вероятно, за счет действия только на клетки, готовые к апоптозу. Ранее нами было обнаружено действие анфена натрия на антиапоптотические белки семейства Bcl-2 и сделано предположение, что это соединение приводит к апоптозу митохондриальным путем. Поскольку H_2O_2 в низких концентрациях может выступать в качестве вторичного мессенджера и стимулировать внешний путь апоптоза, предполагается, что совместное действие H_2O_2 и анфена натрия приводит к усилению апоптоза за счет активации митохондриального и внешнего сигнального пути.

Ключевые слова: апоптоз, карцинома Льюис, спленоциты, анфен натрия, аннексин V-FITC

DOI: 10.31857/S0041377120070032

Известно, что при апоптозе — естественном процессе программируемой клеточной смерти, не возникает воспаления окружающих тканей. Процесс сопровождается конденсацией хроматина, уменьшением объема ядра и распадом его на отдельные части. Сама клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца. В начале и во время апоптоза на внешней поверхности клеточной мембраны клетки экспонируется фосфатидилсерин, что стимулирует поглощение клеток фагоцитами (Czabotar et al., 2014; Shiratsuchi et al., 1998).

Как известно, апоптоз, необходимый для обновления и жизнедеятельности клеток, в опухолевой клетке подавлен. Этому способствуют мутации ряда белков, (таких, как общий регулятор, страж генома, белок p53), а также увеличение стабильности антиапоптотических белков (таких как Bcl-2). В ряде опухолей обнаружено увеличение содержания белков,

разрушающих апоптосому и препятствующих действию каспаз (XIAP и AVEN), необходимых элементов апоптотического процесса (Liling et al., 2003).

Одной из стратегий противоопухолевой терапии является поиск препаратов и создание новых веществ направленного воздействия, в том числе вызывающих запуск процесса апоптоза по митохондриальному пути. Пространственно затрудненный фенол — антиоксидант анфен натрия, синтезированный в Институте биохимической физики РАН (Москва), способен тормозить свободно-радикальное окисление и взаимодействовать с пероксидными радикалами в клетке. Он также обладает биологической и противоопухолевой активностью, в частности тормозит развитие опухоли при трансплантации мышам опухолевых клеток саркомы 37 (Ерохин др., 2007; Володькин и др., 2013).

Ранее нами было обнаружено, что в клетках карциномы Льюис препарат способен воздействовать на антиапоптотические белки семейства Bcl-2, снижая их содержание, что свидетельствовало о начале апоптоза по митохондриальному пути (Миль и др.,

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый; БЭ — бромид этидиума.

2017, 2018). В то же время пути, которые повышают стабильность раковых клеток, остаются недостаточно изученными. Поэтому мы экспериментально проверили возможность повышения эффективности действия фенольного антиоксиданта анфена натрия, который вызывает апоптоз клеток, при сочетанном воздействии препарата с пероксидом водорода (H_2O_2) в низкой концентрации.

Современные методы позволяют наблюдать процессы, происходящие внутри клеток, с использованием флуорофоров, регистрируемых по флуоресценции. Использование акридинового оранжевого (АО) и бромид атидиума (БЭ) позволяют оценить доли живых, апоптотических и мертвых клеток. В то же время аннексин V, конъюгированный с FITC, специфически связываясь с фосфатидилсеринном, экспонируемым на поверхность мембраны клеток, позволяет выявить клетки на ранних и поздних стадиях апоптоза.

В работе исследовано апоптотическое действие анфена натрия (10^{-4} М) в сочетании с H_2O_2 (5 мкМ) на клетки карциномы Льюис, а также на нормальные клетки – спленоциты мышей в условиях культивирования. H_2O_2 – это природное соединение, которое вырабатывается в клетке в результате окислительных процессов в органеллах клетки в очень низких концентрациях. В настоящее время обнаружено разнонаправленное действие H_2O_2 в разных компартментах клетки. В то же время действие экзогенного H_2O_2 зависит от его концентрации. Установлено, что в низких концентрациях (1–10 мкМ) это соединение действует в клетке как вторичный мессенджер, а при концентрациях от 100 до 500 мкМ вызывает окислительный стресс (Storozhevyykh et al., 2007; Mueller et al., 2008; Ткачук и др., 2012; Hennquez-Olguin et al., 2019).

Учитывая эти свойства, в работе использовали малую концентрацию H_2O_2 . Можно было предполагать, что сочетание двух агентов (H_2O_2 и анфена натрия) позволит стимулировать процесс апоптоза в опухолевых клетках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Лабораторные животные. В работе были использованы мыши-гибриды первого поколения F1 (C57Bl 1/2 DBA) (возраст 3–4 мес., масса 25 г), полученных из питомника лабораторных животных “Пушино”. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). В экспериментах с клетками селезенки использованы

те же мыши. Мышей умерщвляли методом декапитации под эфирным наркозом.

Опухолевые клетки и экспериментальные опухоли. Клетки карциномы Льюис выделяли из опухоли на 14-е сутки после соответствующей трансплантации опухолевых клеток. Опухоль для получения суспензии клеток измельчали в физиологическом растворе, затем диспергировали многократным пропусканием суспензии клеток через фильеру диаметром 1 мм, далее фильтровали через нейлоновую сетку (100 мкм), осаждали центрифугированием при 150 g и ресуспендировали осадок для получения суспензии клеток. Ее затем вводили реципиентам по 0.2 мл в мышцу бедра задней лапы из расчета 7×10^6 клеток на одну мышшь, либо использовали в экспериментах *in vitro*. Число клеток определяли в камере Горяева. Спленоциты из селезенки здоровых мышей выделяли аналогичным способом. При изучении действия исследуемых соединений на клетки опухоли или спленоциты, клетки переводили в среду 199 на растворе Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН) путем 2-х кратного центрифугирования при 150 g и ресуспендирования осадка.

Клетки культивировали в среде 199 при 37°C в различных условиях: в контроле, в присутствии 10^{-4} М анфена, 5 мкМ H_2O_2 и при одновременном присутствии 5 мкМ H_2O_2 и анфена натрия (10^{-4} М). Через определенные промежутки времени (1–3 ч) к взятым аликвотам клеток добавляли флуорофоры для последующих измерений. Количество флуоресцирующих клеток (%) определяли по 20–30 микрофотографиям нескольких препаратов в световом и флуоресцентном режиме в одном поле зрения путем подсчета клеток, используя программу ImageJ. В контрольных клетках по флуоресценции БЭ было определено не более 3% мертвых и поврежденных клеток.

Анфен натрия (2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропана-та натрия) был синтезирован в Институте Химической физики РАН (Москва) в ряду других препаратов из класса пространственно затрудненных фенолов (Володькин и др., 2013). Они обладают антиоксидантными свойствами и действуют на многие биохимические мишени в клетке, в том числе на супероксиддисмутазу (SOD) и протеинкиназу С (Бурлакова и др., 1998; Ерохин и др., 2007).

Флуоресцентная микроскопия. Для выяснения состояния клеток карциномы Льюис при их культивировании с исследуемыми соединениями использовали флуорофоры АО, БЭ, а также аннексин V-FITC. Для этого к взятым аликвотам культивируемых клеток вводили флуорофоры и инкубировали с ними в течение

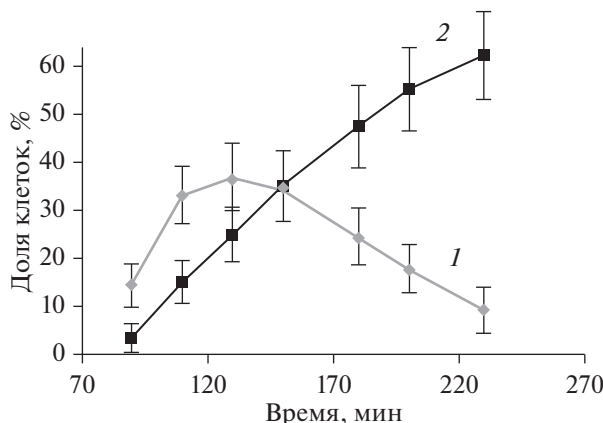


Рис. 1. Изменение количества апоптотических клеток карциномы Льюис (по флуоресценции БЭ в клетках) в зависимости от времени их культивирования с анфеном натрия (АН) в концентрации 10^{-4} М (кривая 1) и с 5 мкМ H_2O_2 в сочетании с АН в той же концентрации (кривая 2). Даны средние значения и их 95%-ные доверительные интервалы.

ние 5 мин. Препараты для флуоресцентной микроскопии готовили на предметном стекле. Наносили суспензию клеток объемом 20 мкл. Использовали покровное стекло. Количество клеток в поле зрения образца при увеличении объектива $40\times$ было около 150. Далее образцы исследовали на флуоресцентном микроскопе.

Использовали лабораторный микроскоп Carl Zeiss Jena (Германия) дополнительно оборудованный оптическими системами возбуждения на диодных лазерах, фильтрации и регистрации на камеру (HD CCD). Использовали объективы с увеличением $40\times$ или $100\times$, длину волны возбуждающего света 450 нм и фильтр, отсекающий возбуждающий свет. Флуорофор АО флуоресцирует в цитоплазме живых клеток, а БЭ позволяет регистрировать флуоресценцию апоптотических и мертвых клеток, связываясь с ДНК фрагментированных ядер и белками живых клеток. Флуоресценцию аннексина V, конъюгированного с красителем FITC, клеток селезенки регистрировали на конфокальном микроскопе Axio Observer Z1 Carl Zeiss Jena (Германия) при возбуждении 488 нм, используя объектив $100\times$. Образцы готовили на покровных стеклах. Количество клеток в поле зрения около 40.

Статистическая обработка. Использовали программу Statistica 6, определяли значения средних величин и 95%-ных доверительных интервалов. Для определения процентного содержания флуоресцирующих клеток в образцах делали выборку флуоресцирующих и всех клеток из 20–30 микрофотографий с помощью программы ImageJ.

Использованные реактивы и среды: эфир для наркоза (Медхимпром, Россия); бромид этидия (Amresco, США); акридиновый оранжевый (Scharlau, Ис-

пания); аннексин V-FITC (AnnexinV fitc/7AAD; Beckman Coulter Company USA.); фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.3–7.5) (Amresco, США); БСА (Sigma, США); HEPES (Biomedicals, Германия); среда 199 на растворе Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН, Москва), KCl (Serva, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения механизма действия противоопухолевого соединения анфена натрия было изучено влияние его и низких концентраций пероксида водорода, а также их совместного действия на культивируемые клетки карциномы Льюис.

Использование флуорофоров АО и БЭ позволило определить изменение состояния клеток при воздействии этих препаратов. Было обнаружено, что флуорофор БЭ в клетках карциномы Льюис вызывал несколько видов флуоресценции: зеленую (живые клетки), желтую или желто-оранжевую (апоптотические) и красную (некротические клетки). В контрольных образцах суспензии клеток обнаруживали около 3% мертвых клеток и этот низкий уровень оставался стабильным в течении эксперимента (1–3 ч). Это позволило проследить за изменением во времени доли живых и апоптотических клеток. Как видно из рис. 1 и 2, при действии анфена натрия число апоптотических клеток сначала увеличивалось (в течение 2 ч), а затем снижалось. Такое двойное действие могло быть проявлением антиоксидантных свойств анфена натрия. Однако при совместном введении 5 мкМ H_2O_2 и анфена натрия апоптотическое действие препаратов значительно усиливалось (число клеток с желтым и оранжевым свечением значитель-

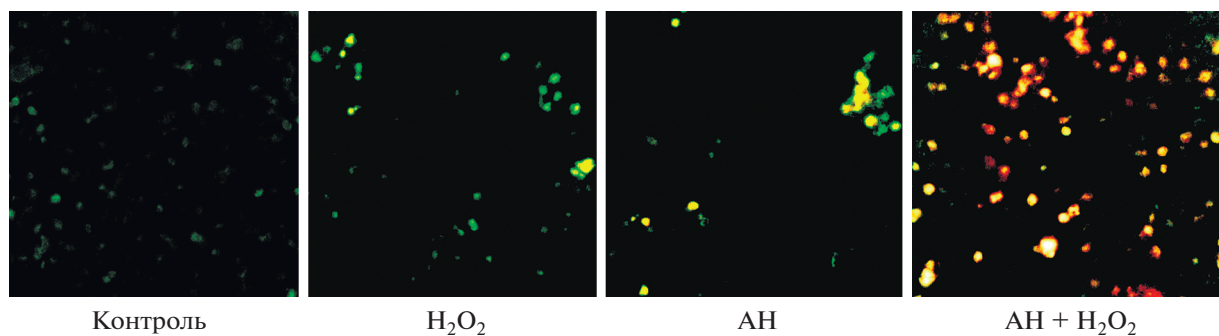


Рис. 2. Микрофотографии флуоресцирующих клеток (окрашенных БЭ) карциномы Льюис после их культивирования (3 ч при 37°C) в контроле, в присутствии 5 мкМ H_2O_2 и 10^{-4} М анфена натрия (АН) раздельно и совместно. Зеленое свечение – окраска белков БЭ, желтое и желто-оранжевое – БЭ в ДНК апоптотических клеток. Об.: 40×.

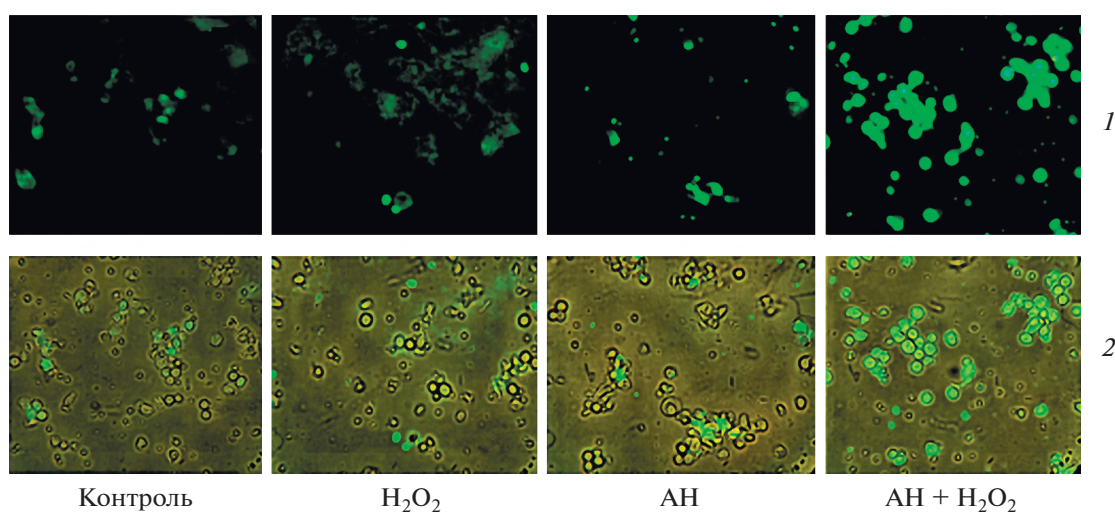


Рис. 3. Флуоресценция аннексина V-FITC в клетках карциномы Льюис после их культивирования (3 ч при 37°C) в контроле, в присутствии 5 мкМ H_2O_2 и 10^{-4} М анфена натрия (АН) раздельно и совместно (микрофотографии 1), а также совмещение флуоресцентного и светового изображений (микрофотографии 2). Об.: 40×.

но увеличивалось), причем сам H_2O_2 в концентрации 5 мкМ не вызывал такого действия (рис. 2).

Действие пероксида водорода и его совместное действие с анфеном натрия было исследовано также с помощью красителя АО, который позволяет оценить состояние плазматической мембраны клеток. Обнаружено, что при культивировании клеток с H_2O_2 (5 мкМ), а также H_2O_2 (5 мкМ) совместно с анфеном натрия (10^{-4} М) через 1 ч происходило 2-кратное увеличение числа флуоресцирующих клеток. Это можно объяснить увеличением проницаемости мембраны клеток под действием малых концентраций H_2O_2 или с действием иных механизмов, связанных с различными путями воздействия на клетку.

Усиление апоптотического эффекта при совместном действии анфена натрия и H_2O_2 было обнаружено также с помощью флуорофора аннексина V-FITC

по увеличению числа клеток, экспонирующих фосфатидилсерин (флуоресценция аннексин V-FITC указывает на появление фосфатидилсерина на поверхности клеток, свидетельствующее о начале процесса апоптоза).

На рис. 3 видно, что после культивирования клеток в контроле и при действии H_2O_2 обнаруживается незначительное количество апоптотических клеток. При действии анфена натрия количество апоптотических клеток составило 45–50%, а при совместном его действии с H_2O_2 количество флуоресцирующих с аннексином V-FITC клеток достигало 90–100%. Эти данные совпадали с данными, полученными с использованием флуорофора БЭ (рис. 1 и 2), и подтверждают увеличение апоптоза при совместном введении этих соединений.

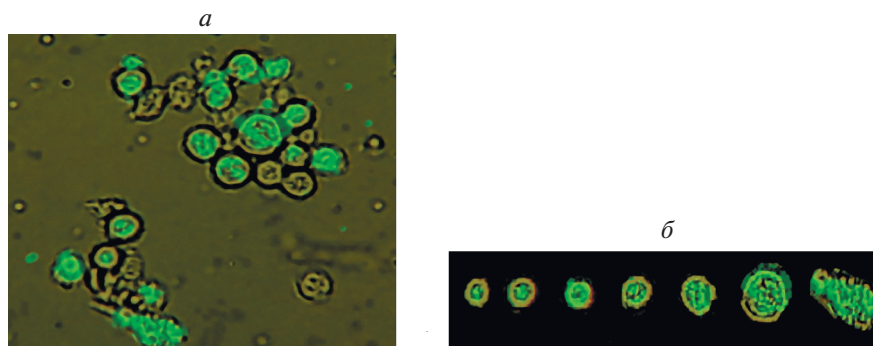


Рис. 4. Микрофотографии флуоресцирующих клеток карциномы Льюис после их культивирования (3 ч при 37°C) в присутствии 5 мкМ H_2O_2 совместно с 10^{-4} М АН. Флуорофор: аннексин V-FITC. *а* – Совмещение флуоресцентного и светового изображений; об.: 100×. *б* – Последовательное образование апоптотических телец в опухолевой клетке (реконструкция из нескольких микрофотографий).

При большем увеличении на флуоресцентном микроскопе через 3 ч культивирования клеток и воздействия этих соединений можно было наблюдать (по флуорисценции аннексина V-FITC) клетки (рис. 4), находящиеся на разных стадиях процесса апоптоза, а также изменение внутреннего строения клеток. Как видно на рис. 4, в клетках карциномы Льюис обнаруживаются флуоресцирующие внутриклеточные образования. Вероятно, это апоптотические тельца, ограниченные мембранами с экспонированным фосфатидилсерином. Число апоптотических телец варьировало от единиц до нескольких десятков, также можно было наблюдать разрыв клеточной мембраны и выход телец во внеклеточное пространство.

Далее в работе было изучено действие исследуемых соединений на нормальные клетки – спленоциты (преимущественно лимфоциты), выделенные из селезенки мышей и культивированные в аналогичных условиях (рис. 5). В контрольных спленоцитах количество апоптотических клеток было незначительным (до 5%). При действии анфена натрия на суспензию клеток селезенки оно составило 10–12%, а при совместном введении анфена натрия с H_2O_2 – 14–16%. Можно предположить, что действие этих соединений на нормальные клетки вызывает апоптоз тех клеток, которые уже готовы к нему, и не затрагивает большинства здоровых клеток.

Как известно, процесс апоптоза характеризуется сложными биохимическими реакциями, протекающими в клетке и в ядре. Ранее нами методом иммуноблоттинга было показано, что анфен натрия в суспензии опухолевых клеток карциномы Льюис через 1–1.5 ч резко снижал содержание антиапоптотического белка Bcl-2, что могло приводить к запуску апоптоза по митохондриальному пути. Мы предположили, что анфен натрия непосредственно связы-

вается с регуляторным доменом ВНЗ белка Bcl-2. (Миль и др., 2018).

Известно, что антиапоптотическая активность Bcl-2 основана на его способности препятствовать образованию пор в митохондриях и олигомеризации белков апоптоза Bax/Bak, а также непосредственно связывать цитохром *c* и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая тем самым активацию каспаз (Laudanski et al., 2001).

При этом происходит процесс фрагментации ядра, образование апоптотических телец, число которых увеличивается, что приводит к разрыву мембраны клеток и высвобождению апоптотических телец во внеклеточное пространство, что наблюдалось при действии H_2O_2 и анфена натрия (рис. 4б). Следует отметить, что начало апоптоза клеток после воздействия анфена, выявленное с помощью флуорофоров, совпадает по времени с обнаруженным ранее методом иммуноблоттинга резким снижением содержания антиапоптотического белка Bcl-2 (димера и мономера), что говорит о начале апоптоза по митохондриальному пути.

Эффект усиления апоптотического действия при действии анфена натрия и H_2O_2 в низкой концентрации требует дальнейшего изучения. По-видимому, этот эффект может быть связан с воздействием на разные сигнальные молекулярные пути идущие в клетке.

Так, ранее было обнаружено, что в клетках рака легкого, обработанных экзогенным H_2O_2 (50–100 мкМ) для образования окислительного стресса, наблюдаются картины апоптоза (аннексин V-FITC-флуоресцирующих клеток), снижение уровня белков Bcl-2 и про-каспазы-3, а также повышение активности каспаз 3 и 8 (Park, 2018).

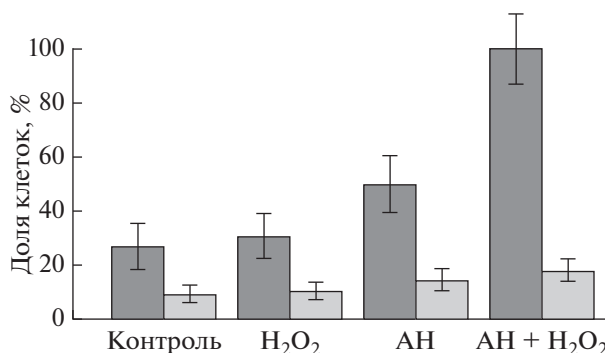


Рис. 5. Диаграмма изменения количества флуоресцирующих клеток карциномы Льюис (темные столбцы) и спленоцитов здоровых мышей (светлые столбцы) после их культивирования (3 ч при 37°C) в контроле, в присутствии 5 мкМ H₂O₂ и 10⁻⁴ М анфена натрия (АН) отдельно и совместно. Флуорофор: аннексин V-FITC. По данным флуоресцентной (клетки карциномы) и конфокальной (спленоциты) микроскопии. Даны средние значения и их 95%-ные доверительные интервалы.

Считается, что в низкой концентрации (1–10 мкМ) H₂O₂ является сигнальной молекулой, вторичным мессенджером, который запускает процессы на поверхности и внутри клетки (Ткачук и др., 2012). Показано, что такие малые концентрации H₂O₂ вызывают митотические процессы и влияют на дифференциацию клеток. Концентрации в пределах 1–100 мкМ стимулируют MAP-киназные каскады, активируя в том числе киназы p38 и JNK в лимфоцитах, что, по-видимому, связано со стимулированием внешнего пути апоптоза (Часовских, 2008). Согласно литературным данным, в малых концентрациях H₂O₂ стимулирует тирозинные фосфатазы, воздействуя на области цистеин-содержащих сайтов и через ряд стадий приводит к сборке гомолога ферментативного комплекса NADPH-оксидазы NOX2 (Storozhevkyh et al., 2007; Mueller et al., 2008; Ткачук и др., 2012; Hennquez-Olguin et al., 2019).. В этих работах делается вывод, что H₂O₂ может являться вторичным мессенджером, который передает сигнал от поверхностных рецепторов, приводя к фосфорилированию и дефосфорилированию ряда киназ и активации MAP-киназного каскада, что может стимулировать внешний путь апоптоза.

Таким образом, в работе показано, что пространственно затрудненный фенол анфен натрия вызывает апоптотические изменения клеток карциномы Льюис, фрагментацию ДНК и выход фосфатидилсерина на поверхность мембраны клеток. Начало этого процесса совпадает по времени со снижением содержания белка Bcl-2 (Миль и др., 2018), свидетельствующем о начале митохондриального пути апоптоза.

Низкие концентрации H₂O₂ могут стимулировать поверхностные трансмембранные рецепторы и затем активировать ряд сигнальных путей с участием MAP-киназ в процессах апоптоза, передавая сигналы в том числе и на митохондрии (Часовских, 2008).

При введении анфена натрия и H₂O₂ в малой концентрации наблюдается увеличение числа апоптотических клеток. Это позволяет предположить, что сигналы апоптоза в этом случае поступают как по внешнему, так и по внутреннему митохондриальному пути, приводя к активации процесса.

Мы предполагаем, что синтетический антиоксидант анфен натрия в сочетании с H₂O₂ может быть более эффективным противоопухолевым средством по сравнению с анфеном натрия для некоторых типов опухолей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с мышами проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурлакова Е. Б., Пальмина Н. П., Мальцева Е. Л. 1998. Природный (альфа-токоферол) и синтетический (калиевая соль фенозана) антиоксиданты как регуляторы активности протеинкиназы в широком диапазоне концентраций. Биол. мембраны. Т. 15. № 2. С. 199. (Burlakova E.B., Palmyna N.P., Maltseva E.L. 1998. Natural (α -tocopherol) and synthetic (phenosan potassium salt) antioxidants regulate the protein kinase C activity in a broad concentration range. Membrane and Cell Biology. V. 12. № 2. P. 251.)

- Володькин А.А., Ерохин В.Н., Бурлакова Е.Б., Заиков Г.Е., Ломакин С.М. 2013. Строение и биологические свойства 1-карбокси-1-(*n*-метиламид)-2-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенил)-пропанатов натрия и калия. Хим. физика. Т. 32. № 2. С. 66. (Volodkin A.A., Erokhin V.N., Burlakova E.B., Zaikov G.E., Lomakin S.M. 2013. Structure and biological properties of 1-carboxy-1-(*n*-methylamide)-2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-propanates of sodium and potassium. Chem. Phys. V. 32. № 2. P. 66.)
- Ерохин В.И., Кременцова В.Н., Семёнов В.А., Бурлакова Е.Б. 2007. Влияние антиоксиданта-бета-(4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенил)пропионовой кислоты (фенозана) на развитие злокачественных новообразований. Изв. акад. наук. Сер. биол. № 5. С. 583. Erokhin V.N., Kremetsova A.V., Semenov V.A., Burlakova E.B. 2007. Effect of antioxidant β -(4-hydroxy-3,5-ditertbutylphenyl)propionic acid (phenosan) on the development of malignant neoplasms. Biol. Bull. V. 34. № 5. С. 485.)
- Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н. 2018. Действие перспективного противоопухолевого фенольного антиоксиданта анфена натрия на белки семейства Bcl-2. Докл. акад. наук. Т. 482. № 5. С. 598. (Mil E.M., Binyukov V.I., Yerokhin. 2018. Effect of Promising Antitumor Phenolic Antioxidant Anphen Sodium on the Bcl-2 Family Proteins. Dokl. Akad. Nauk. V. 482. № 1. P. 268.)
- Миль Е.М., Ерохин В.Н., Бинюков В.И., Семёнов В.А., Албантова А.А., Блохина С.В. 2017. Снижение уровня белка Bcl-2 при развитии карциносаркомы Льюис. Бюл. Экспер. биол. мед. Т. 164. № 11. С. 630. (Mil E.M., Erokhin V.N., Binyukov V.I., Semenov V.A., Albantova A.A., Blokhina S.V. 2018. Decrease in Bcl-2 protein level during the development of Lewis carcinosarcoma. Bull. Exp. Biol. Med. V. 164. № 5. P. 673.)
- Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воронников А.В. 2012. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. Биол. мембраны. Т. 29. № 1/2. С. 21. (Tkachuk V.A., Tyurin-Kuz'min P.A., Belousov V.V., Vorotnikov A.V. 2012. Hydrogen peroxide as a new secondary messenger. Biol. Membrany. (Russ.). V. 29. P. 1.)
- Часовских Н.Ю. 2008. Роль протеинкиназ JNK и p38 в регуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе. Бюл. сиб. мед. № 4. С. 38. (Chasovskikh N.Yu. 2008. The role of protein kinases JNK and p38 in the regulation of apoptosis in mononuclear leukocytes in blood under oxidative stress. Bull. Sib. Med. (Russ.). № 4. P. 38.)
- Czabotar P.E., Lessene J., Stresser A., Adams J.M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 15. P. 49.
- Hennquez-Olguin C., Boronat S., Cabello-Verrugio C., Jaimovich E., Hidalgo E., Jensen T.E. 2019. The emerging roles of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 in skeletal muscle redox signaling and metabolism. Antioxid. Redox. Sign. V. 3. P. 1371.
- Laudanski J., Niklinska W., Burzykowski T., Chyczewski L., Niklinski J. 2001. Prognostic value of serum p53 antibodies in patients with resected non-small cell lung cancer. Eur. Respir. V. 1. P. 660.
- Liling Y., Tetsuo M., Shigeo S., Mikiko M., Hirosh S., Takao I.Y., Tomoko O., Takashi T. 2003. Predominant suppression of apoptosis by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. Cancer Res. V. 63. P. 831.
- Mueller A.S., Klomann S.D., Wolf N.M., Schneider S., Schmidt R., Spielmann J., Stanql G., Eder K., Pallauf J. 2008. Redox Regulation of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by manipulation dietary selenium affects of the triglyceride concentration in rat liver. J. Nutr. V. 138. P. 2328.
- Park W.H. 2018. Hydrogen peroxide inhibits the growth of lung cancer cells via the induction of cell death and G1-phase arrest. Oncol. Rep. V. 40. P. 1787.
- Shiratsuchi A, Osada S. Kanazawa S. Mikanishi Y. 1998. Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. (BBRS). V. 246. P. 549.
- Storozhevyykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.C., Pomytkin I.A. 2007. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. BMC Neurosci. V. 8. P. 84.

Exposition of Phosphatidylserine in Lewis Carcinoma Cells under the Action of Anphen Sodium and Hydrogen Peroxide

E. M. Mil^{a,*}, V. I. Binyukov^a, V. N. Erokhin^a, A. A. Albantova^a, A. A. Volodkin^a, and A. N. Goloshchapov^a

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: elenamil2004@mail.ru

The apoptotic effect of an antioxidant, spatially hindered phenol of anphen sodium, which has antitumor activity, in particular, inhibits the development of tumor cells of sarcoma 37, has been investigated. It was found that the introduction of anphen sodium (10^{-4} M) into the Lewis carcinoma cell culture of mice after 1–1.5 hours resulted in phosphatidylserine exposition and the beginning of the apoptosis process of cells (by annexin-FITC fluorescence). Under the combined action of H_2O_2 (5 μ M) and anphen sodium, cell permeability for the acridine orange fluorophore increased, and the number of apoptotic cells increased to 80–100%. Moreover, in the tumor cells, the formation of both single and numerous apoptotic bodies was observed inside the cell. Under the same conditions, a smaller

number of apoptotic cells (14–16%) were found in spleen cells (splenocytes) of healthy mice, probably due to acting only on cells ready for apoptosis. Earlier, we discovered the effect of anphen sodium on antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family, and it was suggested that this compound causes the mitochondrial apoptosis pathway. At the same time, it is known that hydrogen peroxide in low concentrations can act as a secondary messenger and stimulate the external apoptosis pathway. It is assumed that the combined action of hydrogen peroxide and anphen sodium increases apoptosis due to the activation of the mitochondrial and external signaling pathways.

Keywords: apoptosis, Lewis carcinoma, splenocytes, anphen sodium,annexin V-FITC