

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.71>**МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ**

Научная статья

**Волков В.В.<sup>1</sup>, Мамаева К.И.<sup>2</sup>\***<sup>1</sup> Ивановская пожарно-спасательная академия ГПС МЧС России, Иваново, Российская Федерация<sup>2</sup> Ивановский государственный университет, Иваново, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (masyatka2000[at]gmail.com)

**Аннотация**

Рассмотрены основные механизмы возникновения онкологических заболеваний радиационной, химической и экологической этиологии, а также некоторые активно применяющиеся методики тестирования потенциальных противоопухолевых соединений на биологических объектах для проверки их терапевтического действия. Показана роль окислительного стресса как состояния нарушенного баланса между эффективностью антиоксидантов и продукцией свободных радикалов, основным источником которых являются митохондриальные электрон-транспортные цепи. Обсуждено значение гликолиза, представляющего собой основной метаболический путь неопластических клеток и способ получения ими энергии. Нацеливание на данные процессы может рассматриваться в качестве перспективных лекарственных мишеней при терапии онкопатологий.

**Ключевые слова:** аэробный гликолиз, митохондриальная цепь переноса электронов, окислительный стресс, онкогенез, трансмембранный потенциал, перекисное окисление липидов, сафранин.

**METHODS OF BIOTESTING CHEMICAL COMPOUNDS FOR ANTITUMOUR ACTIVITY**

Research article

**Volkov V.V.<sup>1</sup>, Mamaeva K.I.<sup>2</sup>\***<sup>1</sup> Ivanovo Fire and Rescue Academy of the Ministry of Emergency Situations of Russia, Ivanovo, Russian Federation<sup>2</sup> Ivanovo State University, Ivanovo, Russian Federation

\* Corresponding author (masyatka2000[at]gmail.com)

**Abstract**

The main mechanisms of oncological diseases of radiation, chemical and environmental etiology are reviewed, as well as some actively used methods of testing potential antitumour compounds on biological objects to verify their therapeutic effect. The role of oxidative stress as a state of disturbed balance between the effectiveness of antioxidants and the production of free radicals, the main source of which are mitochondrial electron-transport chains, is demonstrated. The importance of glycolysis, which represents the main metabolic pathway of neoplastic cells and the way they obtain energy, is discussed. Targeting these processes can be considered as promising drug targets in the therapy of oncopathologies.

**Keywords:** aerobic glycolysis, mitochondrial electron transfer chain, oxidative stress, oncogenesis, transmembrane potential, lipid peroxidation, safranin.

**Введение**

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности людей во всем мире. Несмотря на значительные успехи в лечении злокачественных новообразований, все же данная патология характеризуется достаточно высоким уровнем летальности и представляет собой серьезную экономическую и социальную проблему. По данным ВОЗ от 2020 года, в мире было диагностировано более 19 млн. пациентов с различными онкологическими заболеваниями, и смертность от них составила почти 10 млн. Ожидается, что к 2040 году эти показатели достигнут примерно 28 млн. и 16 млн. соответственно [16].

В связи с высоким уровнем смертности от онкологии в течение последних десятилетий важной областью научных исследований является изучение метаболизма опухолевых клеток и разработка противоопухолевых препаратов.

**Основная часть**

Онкогенез – это многоступенчатый процесс, который включает мутационные изменения и неконтролируемую пролиферацию клеток. Исследования установили, что причинную и способствующую роль в инициации и прогрессировании опухоли играет окислительный стресс [12]. Он представляет собой состояние нарушенного баланса между эффективностью антиоксидантов и продукцией свободных радикалов, основным источником которых являются локализованные в митохондриях электрон-транспортные цепи (ЭТЦ) [14]. Длительные повышенные уровни активных форм кислорода, азота, липидов, вызванные снижением антиоксидантной защиты организма, могут вызвать нестабильность важных макромолекул, приведя к клеточной дисфункции, что является основой воспалительных процессов, сердечно-сосудистых заболеваний, онкологии и других заболеваний [6].

Патогенез и этиология онкологических заболеваний очень разнообразны. По современным представлениям, независимо от вида канцерогенного воздействия, во всех опухолевых клетках происходят общие процессы, главным из которых является метаболическое перепрограммирование, характеризующееся сдвигом в энергообеспечении от митохондриального окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу. Он дает неопластическим клеткам для

выживания определенные преимущества перед неопухолевыми клетками. Во-первых, активный гликолиз позволяет клеткам выживать в условиях рано или поздно развивающейся кислородной недостаточности в злокачественной опухоли. Во-вторых, аэробный гликолиз позволяет перенаправлять метаболические промежуточные продукты на различные пути биосинтеза, способствуя синтезу макромолекул и новых органелл [8]. В-третьих, клетки опухоли образуют молочную кислоту как конечный продукт аэробного гликолиза, который, экспортируясь во внеклеточное пространство, вызывает его подкисление, что ингибирует функцию иммуносупрессивных клеток, включая макрофаги и лимфоциты типа M2, что еще больше облегчает выживание опухолевых клеток [9].

Учитывая сложность механизмов возникновения и прогрессирования злокачественных новообразований, особенно при их радиационной, химической и экологической этиологии (происхождении), разрабатываемые противоопухолевые препараты должны обладать комплексным многоцелевым действием с минимумом побочных эффектов. Прежде чем отправить вещества, обладающие потенциальной противоопухолевой активностью, на доклинические испытания, необходимо провести ряд экспериментов, нацеленных на получение достоверной информации об их терапевтическом действии. Разработаны разнообразные системы тестирования различных химических соединений для выявления механизмов противоопухолевого эффекта, основанные на использовании биологических материалов.

В частности, для оценивания влияния химических агентов на процесс перекисного окисления липидов мембран очень широко используется реакция с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест). Мембраны клеток и органелл являются наиболее чувствительными к повреждению свободными радикалами, так как их основным компонентом являются липиды, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Активные формы кислорода и азота могут способствовать окислению ПНЖК, что вызывает перекисное окисление липидов (ПОЛ). Оно изменяет липид-липидные взаимодействия, проницаемость мембран, ионные градиенты, что в конечном счете может привести к гибели клеток [10].

В основе ТБК-теста лежит реакция 2-тиобарбитуровой кислоты с конечным продуктом ПОЛ — малоновым диальдегидом (МДА) [13]. В результате реакции образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 540 нм. В дальнейшем проводят измерение оптической плотности супернатанта. Инициатором, ускоряющим реакцию окисления, могут служить ионы двухвалентного железа ( $\text{FeSO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ), запускающие реакцию Фентона, в ходе которой образуются свободные радикалы. Эксперимент проводится на гомогенате мозга крысы, так как мозг содержит уникальные мембранные структуры – миелиновые оболочки, которые имеют самое высокое содержание липидов (до 80%) по сравнению с другими тканями или субклеточными структурами [1].

С помощью ТБК-теста можно улавливать наномолярные концентрации чистого МДА-стандарта. Быстрота, простота использования и высокая чувствительность анализа ТБК сделали его наиболее распространенным методом, несмотря на некоторые ограничения. В основном это:

- низкая стабильность МДА в биологических образцах из-за его высокой склонности к взаимодействию с белками, аминокислотами и т.д. и быстрой ферментативной деградации;
- плохая воспроизводимость результатов анализа [11];
- неспецифичность, так как даже в идеальных условиях эксперимента использование МДА, как количественного индекса, ограничено, поскольку его источником могут быть продукты разложения ДНК при её окислительном повреждении, и, возможно, других нелипидных молекул.

Также данный метод даёт информацию только о наличии веществ, реагирующих с ТБК, и не информирует об их природе и составе. Поэтому его следует сочетать с другими маркерами липидной перекисидации [2].

Одним из методов оценки способности потенциальных противоопухолевых соединений влиять на биоэнергетику митохондрий и вызывать гибель патологических клеток является измерение трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ) с использованием потенциалзависимой флуоресцирующей метки – сафранина [5].

Суть метода заключается в энергизации изолированных митохондрий печени крысы сукцинатом калия – субстратом второго комплекса ЭТЦ, ингибировании первого комплекса ЭТЦ митохондрий (НАДФ-дегидрогеназы) ротеноном и добавлении на этом фоне исследуемых соединений к митохондриям. После чего наблюдают изменение мембранного потенциала органелл за счёт усиления интенсивности флуоресценции сафранина (рис. 1). Анализ полученных данных проводят с помощью графика зависимости разности изменения светопоглощения при 524 и 554 нм от времени.

Сложности данного метода связаны с необходимостью получения большого количества изолированных митохондрий с высокой вероятностью необратимого образования агрегатов и повреждения при выделении. В связи с этим, для качественной очистки митохондрий Панов А.В., автор монографии «Практическая функциональная митохондриология. Становление новых парадигм», советует использовать среду выделения, содержащую 225 мМ сахарозы и 75 мМ маннитола. Наоборот, в среде, содержащей высокую концентрацию маннитола (225 мМ), очистка митохондрий от клеточных остатков происходит хуже из-за более низкой плотности, чем среда с 225 мМ сахарозы, и сильного загрязнения маннитола ионами кальция, по-видимому, связанного со способом производства маннитола [3].

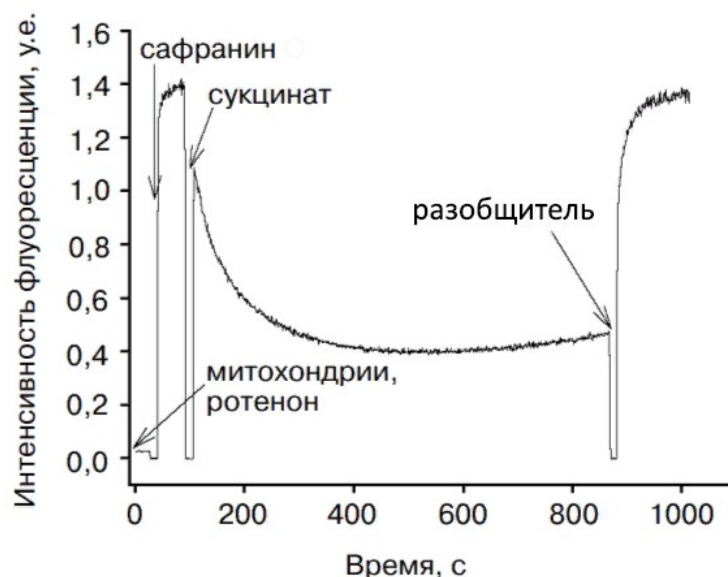


Рисунок 1 - Запись флуоресценции 10 мкМ сафранина в суспензии митохондрий (0,4 мг/мл), зарегистрированная на обычном флуориметре

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.71.1>

Примечание: добавки - ротенон 1 мкМ, сукцинат 5 мМ, разбавитель 100 мкМ; по ист. [4]

В ряде работ показано, что соединения, ингибирующие гликолиз, обладают выраженным противоопухолевым потенциалом, и способны приводить к гибели трансформированных клеток. Влияние тестируемых соединений на интенсивность гликолиза культур опухолевых клеток исследуют с использованием анализатора клеточного метаболизма Agilent Seahorse XF96e Analyzer. В частности, этот аппарат анализирует скорость внеклеточного закисления среды (СВЗС) и измеряет окислительное фосфорилирование митохондрий на основе скорости потребления кислорода (СПК) посредством анализа живых клеток в режиме реального времени [18].

После добавления тестируемых соединений к клеткам последовательно добавляют глюкозу для усиления интенсивности гликолиза, олигомицин, который снижает СПК, ингибируя АТФ-синтазу, и 2-фтор-2-дезоксид-глюкозу (2-ДГ), подавляющую гликолиз (рис. 2). Протокол митохондриального стресс-теста предоставляет информацию о базальном дыхании, дыхании, связанном с АТФ, утечке протонов, максимальной дыхательной способности и немитохондриальном дыхании клеток. Таким образом, этот анализ может быть использован для получения представления о механизме действия химических соединений, которые непосредственно воздействуют на биоэнергетику митохондрий [15].

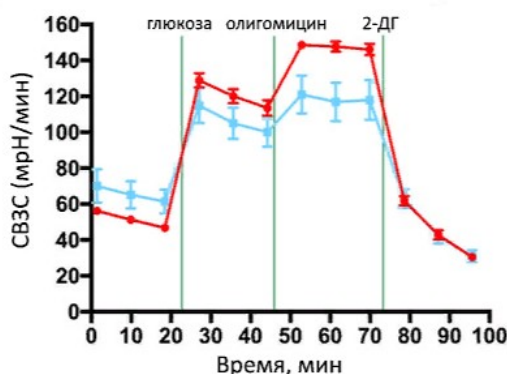


Рисунок 2 - График Seahorse анализа скорости внеклеточного закисления среды

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.71.2>

## Заключение

Вышеописанные методы активно применяются на начальных этапах биологического тестирования как комплексно, так и по отдельности и продолжают совершенствоваться для получения как можно более надежных и

развернутых результатов. Так, большинство технических проблем, связанных с измерением МДА в ТБК-тесте, остаются нерешенными и требуют дальнейшего изучения [11]. Учитывая неспецифичность реакции ТБК с МДА и перекрестной реакции других альдегидов, образующихся в результате перекисного окисления липидов, некоторые исследователи используют общие показатели веществ, реагирующих с ТБК (ТВАР) [7], [17], [19] в качестве биомаркера окислительного стресса вместо значений МДА.

### Конфликт интересов

Не указан.

### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

### Conflict of Interest

None declared.

### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

### Список литературы / References

1. Лелевич В.В. Нейрохимия: учебное пособие для студентов / В.В. Лелевич. — Гродно: ГрГМУ, 2020. — 263 с.
2. Маханова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов / Р.С. Маханова // Биологические науки. — 2011. — С. 231-234.
3. Панов А.В. Практическая функциональная митохондриология. Становление новых парадигм / А.В. Панов. — Новосибирск. 2022. — 290 с.
4. Перевощикова И.В. Сафранин О как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий: исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий / И.В. Перевощикова, А.И. Сорочкина, Д.Б. Зоров [и др.] // Биохимия. — 2009. — Т. 74. — №6. — С. 814-824.
5. Akerman K.E. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential / K.E. Akerman, M.K. Wikström [et al.] // FEBS Letters. — 1976. — Vol. 68. — № 2. — P. 191-197.
6. Dong C. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment / C. Dong, N.J. Zhang, L.J. Zhang // Chinese Medical Journal. — 2021. — Vol. 134. — №16. — P. 1897-1907.
7. El-Ghazaly M.A. Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats / M.A. El-Ghazaly, N. Fadel, E. Rashed [et al.] // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. — 2017. — Vol. 95. — №2. — P. 101-110.
8. Enzo E. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity / E. Enzo, G. Santinon, A. Pocaterra [et al.] // The EMBO Journal. — 2015. — Vol. 34. — №10. — P. 1349-1370.
9. Feng J. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma / J. Feng, J. Li, L. Wu [et al.] // Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. — 2020. — Vol. 39. — № 126. — 19 p.
10. Gaschler M.M. Lipid peroxidation in cell death / M.M. Gaschler, B.R. Stockwell // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2017. — Vol. 482. — №3. — P. 419-425.
11. Khoubnasabjafari M. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders / M. Khoubnasabjafari, K. Ansarin, A. Jouyban // BiolImpacts. — 2015. — Vol. 5. — №3. — P. 123-127.
12. Klaunig J.E. Oxidative stress and cancer / J.E. Klaunig // Current Pharmaceutical Design. — 2018. — Vol. 24. — №40. — P. 4771-4778.
13. Klochkov S.G. Synthesis and antioxidant activity of securinine derivatives / S.G. Klochkov, M.E. Neganova, S.V. Afanas'eva [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2014. — Vol. 48. — №1. — P. 15-17.
14. Pisoschi A.M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review / A.M. Pisoschi, A. Pop // European Journal of Medicinal Chemistry. — 2015. — Vol. 97. — P. 55-74.
15. Plitzko B. Measurement of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in culture cells for assessment of the energy metabolism / B. Plitzko, S. Loesgen // Bio-protocol. — 2018. — Vol. 8. — №10.
16. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R. Siegel [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians. — 2021. — Vol. 71. — №3. — P. 209-249.
17. Xu D. Tetrachloro-p-benzoquinone induces hepatic oxidative damage and inflammatory response, but not apoptosis in mouse: the prevention of curcumin / D. Xu, L. Hu, C. Su [et al.] // Toxicology and Applied Pharmacology. — 2014. — Vol. 280. — №2. — P. 305-313.
18. Zhang J. Seahorse machine to measure OCR and ECAR in cancer cells / J. Zhang, Q. Zhang // Methods in Molecular Biology. — 2019. — Vol. 1928. — P. 353-363.
19. Zini E. Oxidative status of erythrocytes, hyperglycemia, and hyperlipidemia in diabetic cats / E. Zini, G. Gabai, E. Salesov [et al.] // The Journal of Veterinary Internal Medicine. — 2020. — Vol 34. — №2. — P. 616-625.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Lelevich V.V. Neirohimija: uchebnoe posobie dlja studentov [Neurochemistry: textbook for students] / V.V. Lelevich. — Grodno: GrSMU, 2020. — 263 p. [in Russian]
2. Mahanova R.S. K voprosu izuchenija perekisnogo okislenija lipidov [To the issue of studying lipid peroxidation] / R.S. Mahanova // Biologicheskie nauki [Biological Sciences]. — 2011. — P. 231-234. [in Russian]

3. Panov A.V. Prakticheskaja funkcional'naja mitohondriologija. Stanovlenie novyh paradigim [Practical functional mitochondriology. Emergence of new paradigms] / A.V. Panov. — Novosibirsk. 2022. — 290 p. [in Russian]
4. Perevoshhikova I.V. Safranin O kak fluorescentnyj indikator membrannogo potenciala mitohondrij: issledovanie na urovne suspenzii i urovne otidel'nyh mitohondrij [Safranin O as a fluorescent indicator of mitochondrial membrane potential: a study at the suspension level and at the level of individual mitochondria] / I.V. Perevoshhikova, A.I. Sorochkina, D.B. Zorov [et al.] // Biohimija [Biochemistry]. — 2009. — Vol. 74. — №6. — P. 814-824. [in Russian]
5. Akerman K.E. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential / K.E. Akerman, M.K. Wikström [et al.] // FEBS Letters. — 1976. — Vol. 68. — № 2. — P. 191-197.
6. Dong C. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment / C. Dong, N.J. Zhang, L.J. Zhang // Chinese Medical Journal. — 2021. — Vol. 134. — №16. — P. 1897-1907.
7. El-Ghazaly M.A. Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats / M.A. El-Ghazaly, N. Fadel, E. Rashed [et al.] // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. — 2017. — Vol. 95. — №2. — P. 101-110.
8. Enzo E. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity / E. Enzo, G. Santinon, A. Pocaterra [et al.] // The EMBO Journal. — 2015. — Vol. 34. — №10. — P. 1349-1370.
9. Feng J. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma / J. Feng, J. Li, L. Wu [et al.] // Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. — 2020. — Vol. 39. — № 126. — 19 p.
10. Gaschler M.M. Lipid peroxidation in cell death / M.M. Gaschler, B.R. Stockwell // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2017. — Vol. 482. — №3. — P. 419-425.
11. Khoubnasabjafari M. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders / M. Khoubnasabjafari, K. Ansarin, A. Jouyban // BioImpacts. — 2015. — Vol. 5. — №3. — P. 123-127.
12. Klaunig J.E. Oxidative stress and cancer / J.E. Klaunig // Current Pharmaceutical Design. — 2018. — Vol. 24. — №40. — P. 4771-4778.
13. Klochkov S.G. Synthesis and antioxidant activity of securinine derivatives / S.G. Klochkov, M.E. Neganova, S.V. Afanas'eva [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2014. — Vol. 48. — №1. — P. 15-17.
14. Pisoschi A.M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review / A.M. Pisoschi, A. Pop // European Journal of Medicinal Chemistry. — 2015. — Vol. 97. — P. 55-74.
15. Plitzko B. Measurement of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in culture cells for assessment of the energy metabolism / B. Plitzko, S. Loesgen // Bio-protocol. — 2018. — Vol. 8. — №10.
16. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R. Siegel [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians. — 2021. — Vol. 71. — №3. — P. 209-249.
17. Xu D. Tetrachloro-p-benzoquinone induces hepatic oxidative damage and inflammatory response, but not apoptosis in mouse: the prevention of curcumin / D. Xu, L. Hu, C. Su [et al.] // Toxicology and Applied Pharmacology. — 2014. — Vol. 280. — №2. — P. 305-313.
18. Zhang J. Seahorse machine to measure OCR and ECAR in cancer cells / J. Zhang, Q. Zhang // Methods in Molecular Biology. — 2019. — Vol. 1928. — P. 353-363.
19. Zini E. Oxidative status of erythrocytes, hyperglycemia, and hyperlipidemia in diabetic cats / E. Zini, G. Gabai, E. Salesov [et al.] // The Journal of Veterinary Internal Medicine. — 2020. — Vol 34. — №2. — P. 616-625.