

УДК 576.5:576.311:576.31

АЛЬФА-ТОКОФЕРИЛСУКЦИНАТ ИНДУЦИРУЕТ СТРЕСС ЭПР, НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ И АПОПТОЗ В КУЛЬТУРЕ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2024 г. М. А. Савицкая¹, И. И. Захаров¹, А. А. Саидова¹,
Е. А. Смирнова¹, Г. Е. Онищенко¹, *

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

* E-mail: nakomis@mail.ru

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Сукцинат витамина Е (СВЕ) – потенциальный противоопухолевый агент, известный своим направленным воздействием на митохондрии опухолевых клеток. Однако данные о проапоптозном механизме действия СВЕ неоднозначны, а воздействие СВЕ на нормальные нетуморогенные клетки изучено недостаточно полно. Ранее удалось показать индукцию апоптоза по митохондриальному механизму при действии СВЕ на клетки эпидермоидной карциномы человека А431. Цель нашей работы – исследовать влияние СВЕ на нетуморогенные клетки и выявить общие механизмы, которые характерны как для нормальных, так и для опухолевых клеток, и механизмы, проявляющиеся только в одной из категорий клеток. Для достижения этой цели изучали действие СВЕ на такие органеллы, как эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и аппарат Гольджи, анализировали экспрессию генов, связанных со стрессом ЭПР, а также оценивали содержание АФК и накопление липидных капель в цитоплазме в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 и иммortalизованных кератиноцитах человека HaCaT. Показано, что в клетках обеих линий присутствуют признаки стресса ЭПР, возрастает содержание АФК и липидных включений, увеличивается число апоптотических клеток. При этом ключевое различие механизмов индукции апоптотической гибели клеток А431 и HaCaT при действии СВЕ лежит в реакции митохондрий: в клетках А431 запуск апоптотической гибели осуществляется по митохондриальному механизму, в то время как клетки линии HaCaT вступают в апоптоз без участия митохондрий. Таким образом, мишени воздействия СВЕ на нормальные и опухолевые клетки могут различаться и, возможно, способны дополнять друг друга при индукции апоптоза.

Ключевые слова: α-токоферилсукцинат, стресс ЭПР, апоптоз, липидные включения, АФК

Принятые сокращения: АИ – апоптотический индекс; АФК – активные формы кислорода; СВЕ – сукцинат витамина Е; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; грЭПР – гранулярный ЭПР.

DOI: 10.31857/S0041377124020071, **EDN:** RJVGQV

Ежегодно у огромного числа людей во всем мире развиваются злокачественные новообразования; в результате таким лицам приходится подвергаться порой изнурительному лечению, которое далеко не всегда бывает эффективным. Часто злокачественные опухоли приводят к смерти, являясь одной из самых распространённых ее причин. Поэтому необходимо разрабатывать новые противоопухолевые соединения, которые бы обладали селективностью по отношению к опухолевым клеткам, не затрагивая в значительной степени жизнедеятельность нормальных клеток и тканей. В качестве таких агентов можно рассматривать низкомолекулярные вещества с селективным противоопухолевым эффектом, воздействующие

в первую очередь на митохондрии злокачественных клеток, которые получили название митоканы (Bjelakovic et al., 2004, Rodriguez-Enriquez et al., 2009; Dong et al., 2011). Среди них наиболее известны производные антиоксиданта витамина Е, в том числе α-токоферилсукцинат (или сукцинат витамина Е – СВЕ), который представляет собой сложный эфир α-токоферола и янтарной кислоты. Изначально он был выделен из зеленых листьев ячменя и описан как соединение, стимулирующее выделение гормона роста клетками передней доли гипофиза (Badamchian et al., 1994).

Биологические эффекты СВЕ разнообразны. Так, он способен подавлять активность холинэстераз, ингибировать активность NF-κB, а также

обладает широким спектром противоопухолевых эффектов (Савицкая и др., 2016; Majima et al., 2019).

Противоопухолевую активность СВЕ чаще всего связывают с его воздействием на митохондрии и индукцией апоптоза по митохондриальному механизму (Weber et al., 2003; Yu et al., 2003; Wang et al., 2005; Neuzil et al., 2007; Dong et al., 2008; Zhao et al., 2009; Prochazka et al., 2010; Савицкая и др., 2012; dos Santos et al., 2012; Gruber et al., 2014; Rauchová et al., 2014). Однако такой митохондриальный путь может быть не единственным. Например, известно, что в апоптозе, индуцированном воздействием СВЕ, может участвовать и стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Huang et al., 2010, 2013).

Стресс ЭПР — клеточное состояние, наступающее в случае накопления неправильно свернутых белков. Он может быть вызван недостатком питательных веществ, изменениями статуса гликозилирования, гипоксией, нарушениями гомеостаза кальция и воздействием разнообразных агентов (Huang et al., 2010). В ответ на стресс ЭПР активируются высокоспецифичные сигнальные пути, направленные на устранение белковой нагрузки и восстановление гомеостаза. В таком ответе на несвернутые белки (unfolded protein response, UPR) участвуют шапероны, например, BiP (GRP78), сенсоры (IRE1, PERK, ATF6) и транскрипционные факторы (например, ATF6, ATF4 и CHOP). Если восстановить гомеостаз не удастся, UPR также может индуцировать апоптотическую клеточную гибель. В предыдущем исследовании нами подробно описана индукция митохондриального механизма апоптоза под действием СВЕ в клетках эпидермоидной карциномы A431 (Савицкая и др., 2012).

В нынешней работе охарактеризована гибель иммортализованных кератиноцитов HaCaT при воздействии СВЕ, а также исследовано участие ЭПР и аппарата Гольджи в апоптотической гибели клеток A431 при воздействии этого соединения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Биологический материал. Работа проведена на культурах клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (из Коллекции культур клеток позвоночных; ЦКП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) и иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT (УНУ: Коллекция клеточных культур; ЦКП Института биологии развития

им. Н. К. Кольцова РАН, Москва; любезно предоставлены Е. А. Воротеляк). Для культивирования клеток использовали среду DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащую 10% фетальной сыворотки теленка (“ПанЭко”, Россия), 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”, Россия), 80 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия) и 100 мкг/мл амфотерицина В (“Синтез”, Россия). Культуру клеток поддерживали при 37 °C и 5% CO₂. Пассирование проводили смесью раствора Версена и 0.25% трипсина (7:3) (“ПанЭко”, Россия).

Постановка эксперимента. Клетки высаживали на стекла в чашки Петри в концентрации 200–300 тыс./мл. Необходимые концентрации α-токоферилсукцината СВЕ (Sigma, США) получали из маточного спиртового (96% этанол) раствора (100 мМ) и хранили при –20 °C. Агент вносили в среду культивирования через 24 ч после посадки в концентрации 20, 40, 60 или 100 мкМ. Так как в качестве растворителя для СВЕ применяли этанол, в каждом эксперименте использовали два контроля: без добавления каких-либо растворов и с добавлением спирта в объеме, соответствующем максимальному вносимому объему СВЕ. Далее клетки фиксировали или окрашивали прижизненно через 24, 48 или 72 ч после добавления СВЕ в соответствии с поставленной задачей. Каждый эксперимент имел не менее трех биологических повторов.

Оценка жизнеспособности клеток. Использовали МТТ-тест. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет, при этом в каждую лунку вносили 90 мкл среды с суспензией клеток. Через 24 ч культивирования в каждую лунку добавляли по 10 мкл 96%-ного этилового спирта или 10 мкл спиртового раствора СВЕ в необходимой концентрации и культивировали далее на протяжении 48 ч. Затем реактив МТТ разводили культуральной средой до концентрации 1.5 мг/мл и в каждую лунку добавляли по 20 мкл полученного раствора (конечная концентрация составляла 0.25 мг/мл). Через 1–2 ч отбирали среду и на 15–30 мин добавляли в лунку по 60 мкл DMSO для растворения образовавшихся гранул формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан (“Пикон”, Россия).

Световая микроскопия в светлом поле. Клетки фиксировали через 24, 48 и 72 ч после внесения в среду культивирования раствора СВЕ в концентрациях 20, 40, 60 или 100 мкМ. Для этого стекла с клетками промывали 0.1 М раствором PBS pH 6.9 (Sigma, США) и фиксировали в течение 30 мин фиксатором Буэна (15 частей насыщенного

раствора пикриновой кислоты, 5 частей 40%-ного раствора формальдегида, 1 часть ледяной уксусной кислоты), после чего трижды промывали PBS, окрашивали гематоксилином в течение 2–3 мин, промывали проточной водой и докрашивали эозином в течение 30 с. Далее клетки обезвоживали в спиртах (70, 96%) и двух сменах толуола и заключали в канадский бальзам. На готовых препаратах подсчитывали число апоптотических клеток на 1000–1500 клеток (апоптотический индекс). Идентификацию апоптотических клеток проводили по морфологическим признакам, таким как уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блеббинг и распад на апоптотические тельца.

Оценка уровня активных форм кислорода (АФК).

Для оценки доли клеток с избытком АФК использовали прижизненное наблюдение. В среду культивирования вносили 2',7'-дихлорофлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA) (BioChemika, США; рабочая концентрация 10 мкМ), который служит маркером присутствия пероксида водорода и других перекисных соединений, а также гидроксильного аниона. В присутствии активных форм кислорода (пероксида) в клетке образуется флуоресцирующий продукт окисления 2',7'-дихлорофлуоресцеиндиацетата — дихлорофлуоресцеин. Клетки прижизненно исследовали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) при увеличении объектива 63× с масляной иммерсией (PlanApo 63×/1.4) (Carl Zeiss Inc., Германия), снабженном черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Carl Zeiss Inc., Германия) и программным обеспечением AxioVision 3.1.

Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание фиксированных клеток. Для визуализации митохондрий использовали флуоресцентный краситель MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fischer Scientific, США). Красители вносили в среду культивирования в концентрации 100 нМ на 30 мин, после чего клетки отмывали в среде DMEM, не содержащей сыворотки, помещали в PBS и далее фиксировали 4%-ным формальдегидом на PBS. Полученные препараты заключали в смесь PBS с глицерином (1:1).

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки фиксировали 4%-ным формалином на 0.1 М PBS в течение 20 мин и трижды промывали 0.1 М PBS. Для пермеабилзации мембран фиксированные клетки на 3–5 мин помещали в 1%-ный раствор Triton X100 при комнатной температуре.

При иммуноцитохимическом окрашивании клетки помещали в раствор бычьего сывороточно-

го альбумина на PBS и далее последовательно инкубировали с первыми и вторыми антителами. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела мыши к активной форме каспазы 3 (1:100, клон 84803.111, C5737; Sigma, США), моноклональные антитела мыши к белку аппарата Гольджи 58K (1:50, клон 58K-9, G2404; Sigma, США) и поликлональные антитела овцы к цитохрому c (1:100, C5723; Sigma, США). В качестве вторых антител использовали моноклональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с FITC (F9006, Sigma, США) или Alexa-488 (A11001; Invitrogen, США) и антитела к IgG овцы, конъюгированные с Alexa Fluor-546 (A21098; Invitrogen, США).

Полученные препараты заключали в смесь глицерина и PBS (1:1), смесь глицерина и PBS (1:1), содержащую 100 нМ DAPI (Merck, Германия) или Мовиол 4-88 (Hoechst, Германия), и исследовали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) при увеличении объектива 63× с масляной иммерсией (PlanApo 63×/1.4) (Carl Zeiss Inc., Германия), снабженном черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Carl Zeiss Inc., Германия) и программным обеспечением AxioVision 3.1 (Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Клетки фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом с добавлением 2%-ного формалина на 0.1 М PBS pH 7.2 (Sigma, США), дважды промывали PBS и дофиксировали 1%-ным OsO₄. Далее проводили стандартную процедуру проводки для трансмиссионной электронной микроскопии и заключали материал в Epon 812 (Fluka, Швейцария). Срезы толщиной 60–80 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultratom-5 (LKB, Германия) и окрашивали 1.5%-ным раствором уранилацетата 30 мин в темноте и 5 мин цитратом свинца по Рейнольдсу в наличии гидроксида натрия.

Готовые препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN (Япония), и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, Япония) с цифровой фотокамерой OLYMPUS C-770 под управлением программы ImageScope (Великобритания).

Выявление нейтрального жира. Клетки фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на проточной воде 24 ч, промывали проточной водой 2 ч. Затем материал переносили в 50%-ный

этиловый спирт и сразу помещали в раствор судана III (70%-ный раствор на 96%-ном этаноле (“ХимПром”, Россия) на 25 мин. Далее препарат помещали в 50%-ный спирт, промывали в дистиллированной воде и заключали в смесь PBS (Sigma, США) с глицерином (CDH, Индия).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Чтобы оценить влияние СВЕ на экспрессию генов, участвующих в стрессе ЭПР, использовали количественную ПЦР-РВ. Для анализа были выбраны ген *CHOP*, продукт которого представляет собой транскрипционный фактор, участвующий в индукции апоптоза при стрессе ЭПР, *GRP78*, кодирующий шаперон, и *ATF4*, продукт которого также является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию ряда генов стресса ЭПР, в том числе *CHOP*. Реакцию проводили, как описано в работе (Potashnikova et al., 2015), с использованием следующих праймеров (Sintol, Россия): для гена *CHOP* –

5'-AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC-3'/5'-TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT-3' (Fu et al., 2015); для гена *GRP78* – 5'-TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT-3'/5'-GTCGTTACCTTCGTAAGACCT-3' (Murugan et al., 2015); для гена *ATF4* – 5'-TGGCTGGCTGTGGATGG-3'/5'-TCCCGGAGAAGGCATCCT-3' (Plaisance et al., 2016). Для амплификации референсных генов были использованы следующие праймеры (Vandesompele et al., 2002): для гена убиквитина (*ubiquitin*) – 5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTTG-3'/5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'; для гена *HPRT* – 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'/5'-GGTCCTTTTACCAGCAAGCT-3'; для гена *GAPDH* – 5'-TGCACCACAAGCTTATGCTAGC-3'/5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; для гена *YWHAZ* – 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3'/5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3'. *UBC* – 5'-ATTTGGGTCGCGAGTTCTTG-3'/5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'. Все образцы были обработаны трижды. Один образец кДНК, введенный в каждый цикл ПЦР, служил межсерийным калибратором для объединения данных в один эксперимент. Специфичность праймеров подтверждали анализом кривой плавления и обнаружением продуктов с предсказанной длиной с использованием электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Эффективность амплификации E рассчитывали как $[10(-1/\text{наклон}) - 1]$, используя наклон графика полулогарифмической регрессии S_q в зависимости от логарифмического входа

кДНК. Каждую реакцию проводили в трехкратной повторности. Подбор референсных генов и нормализации результатов был проведен согласно Vandesompele et al. (2002), а также на основании меры стабильности (наименьшего коэффициента вариации) M в программе *geNorm* (<https://genorm.cmgg.be/>). Для нормализации полученных результатов ПЦР во всех экспериментах использовали геометрическое среднее трех референсных генов: *UBC*, *GAPDH* и *YWHAZ*. Результаты анализировали согласно Vandesompele et al. (2002).

Обработка и анализ результатов. Обработку фотографий проводили в программе Adobe Photoshop CS3. Обработка количественных данных, построение гистограмм и вычисление величин стандартного отклонения проводили с использованием языка программирования R (пакеты *tidyverse*, *rstatix* и *ggpubr*) и программы RStudio. Данные на гистограммах представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Каждый эксперимент имел не менее трех независимых биологических повторов на отдельных пассажах клеток. Значение P вычисляли по непараметрическому критерию Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения там, где это применимо. Значение $P < 0.05$ использовали как статистически значимое. Статистические значимые отличия обозначены на гистограммах звездочкой (*).

РЕЗУЛЬТАТЫ

СВЕ снижает жизнеспособность клеток эпидермоидной карциномы A431 и иммортализованных кератиноцитов HaCaT. Жизнеспособность клеток при воздействии СВЕ оценивали с помощью МТТ-теста. Важно отметить, что для использования в экспериментах СВЕ растворяли в 96%-ном этаноле, а культивирование клеток культуры HaCaT в присутствии спирта, объем которого соответствует максимальному объему вносимого раствора СВЕ (0.57%), вызывает статистически значимое снижение жизнеспособности клеток. В связи с этим за контроль (100%-ную жизнеспособность) принимали вариант культивирования клеток в среде, содержащей этанол.

Показано, что спустя 48 ч культивирования клеток A431 в присутствии СВЕ жизнеспособность клеток статистически значимо снижается при концентрации СВЕ 40 мкМ и выше. Так, после воздействия 40 мкМ СВЕ жизнеспособность уменьшается на 8.6%, 60 мкМ – на 58.2, 100 мкМ – на

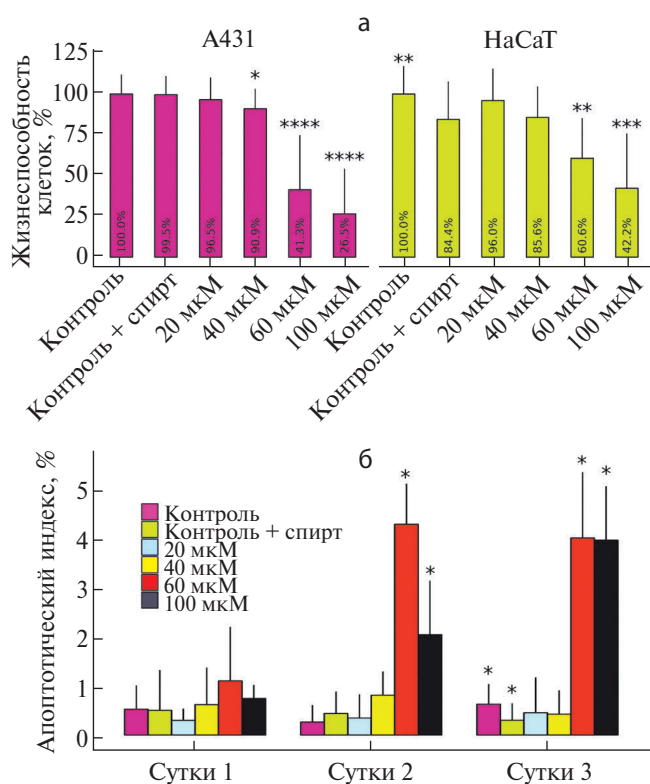


Рис. 1. Реакция культивируемых клеток линий A431 и HaCaT на воздействие сукцината витамина E (СВЕ): *а* – жизнеспособность клеток после культивирования в присутствии СВЕ в течение 48 ч; *б* – величина апоптотического индекса клеток HaCaT при различных концентрациях и времени воздействия СВЕ. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения; различия с контролем с добавлением спирта достоверны при (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ или (****) $P < 0.0001$; $n = 3-4$ (*а*) и $n = 3$ (*б*).

73% (рис. 1*а*). Концентрация 40 мкМ была выбрана для дальнейших исследований, поскольку она оказывает статистически значимое влияние на жизнеспособность клеток, но массовой гибели еще не вызывает.

В клетках линии HaCaT продемонстрировано, что (в отличие от клеток A431) спустя 48 ч после добавления СВЕ значимое снижение жизнеспособности вызывают концентрации агента 60 и 100 мкМ: при действии 60 мкМ – на 23.8%, при действии 100 мкМ – на 42.2%; при этом воздействие 40 мкМ СВЕ не приводит к снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, клетки HaCaT более устойчивы к воздействию СВЕ по сравнению с A431, поскольку значимое снижение их жизнеспособности проходит при более высоких концентрациях агента.

СВЕ вызывает апоптоз в клетках HaCaT. Более раннее исследование, проведенное на клетках A431, показало, что СВЕ вызывает дозозависимую апоптотическую гибель этих клеток при концентрациях 40, 60 и 100 мкМ и культивировании в течение 48 и 72 ч (Савицкая и др., 2012). Анализ клеток HaCaT после воздействия СВЕ показал, как и в случае клеток A431, наличие только апоптотического типа клеточной гибели. В пользу этого говорят морфологические признаки (конденсация хроматина, блеббинг, уплотнение цитоплазмы, распад клетки на апоптотические тельца) и результат иммуноцитохимического выявления активной формы каспазы 3 (рис. 2).

По результатам количественной оценки уровня гибели клеток HaCaT на основе морфологических признаков после окрашивания препаратов

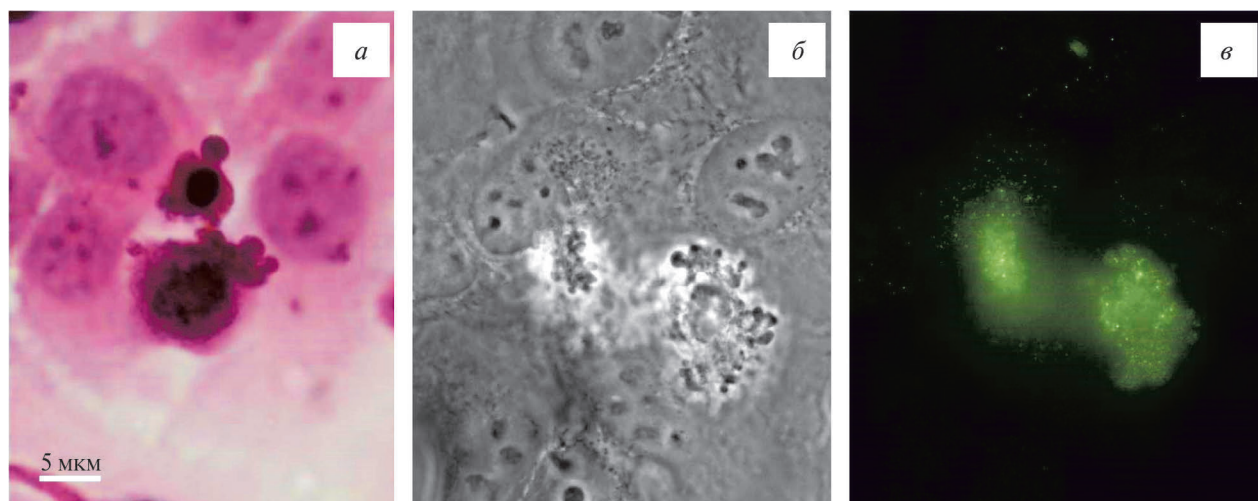


Рис. 2. Апоптоз в клетках HaCaT при действии 60 мкМ СВЕ: *а* – окрашивание гематоксилином и эозином; *б, в* – соответственно фазовый контраст и иммуноцитохимическое выявление каспазы 3 в одной и той же клетке. Показан репрезентативный результат из трех независимых экспериментов.

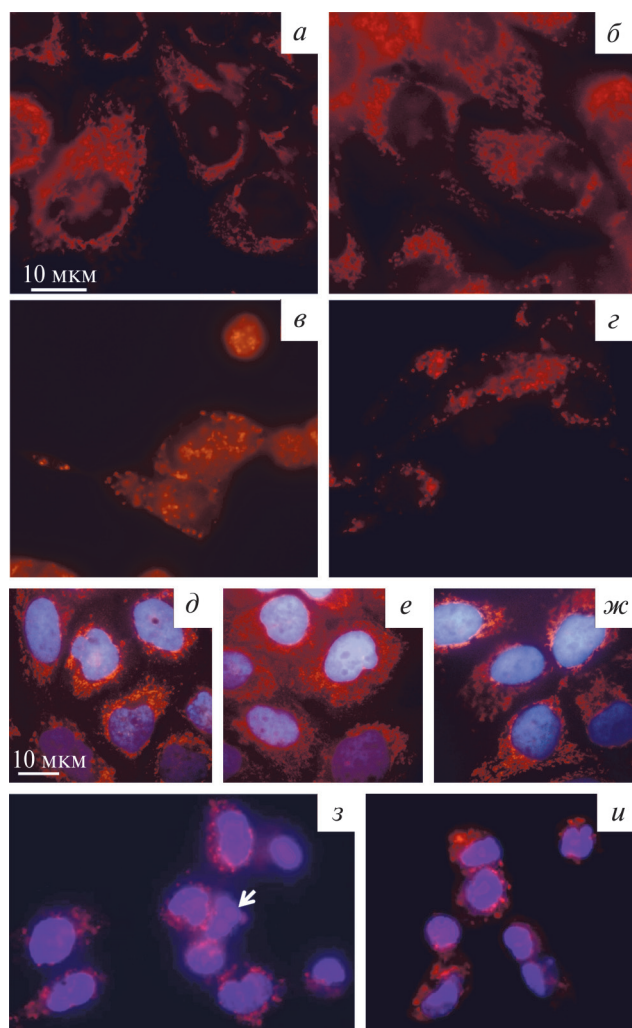


Рис. 3. Митохондрии в клетках линии HaCaT после воздействия СВЕ в течение 48 ч: *а–г* – митохондрии в клетках HaCaT, окрашенные MitoTracker Orange в контроле (*а*) и после действия СВЕ в концентрации 40 (*б*), 60 (*в*) и 100 (*г*) мкМ; *д–и* – иммуноцитохимическое выявление цитохрома *с* в клетках HaCaT в контроле без спирта (*д*) и с добавлением его (*е*), а также после действия СВЕ в концентрации 40 (*ж*), 60 (*з*) и 100 (*и*) мкМ. Показан репрезентативный результат из трех независимых экспериментов.

гематоксилином и эозином значимое увеличение количества апоптотических клеток (значения АИ) выявляется только на вторые и третьи сутки при концентрациях 60 и 100 мкМ, однако и в этом случае величина апоптотического индекса остается на уровне не более 4% (см. рис. 1б).

СВЕ не вызывает изменений структуры митохондрий в клетках HaCaT. В более ранней работе показано, что СВЕ в концентрации 40 мкМ вызывает в клетках A431 изменение структуры митохондрий, заметное как на световом, так и на электронно-микроскопическом уровне, выход цитохрома *с* из митохондрий в цитозоль, усиление

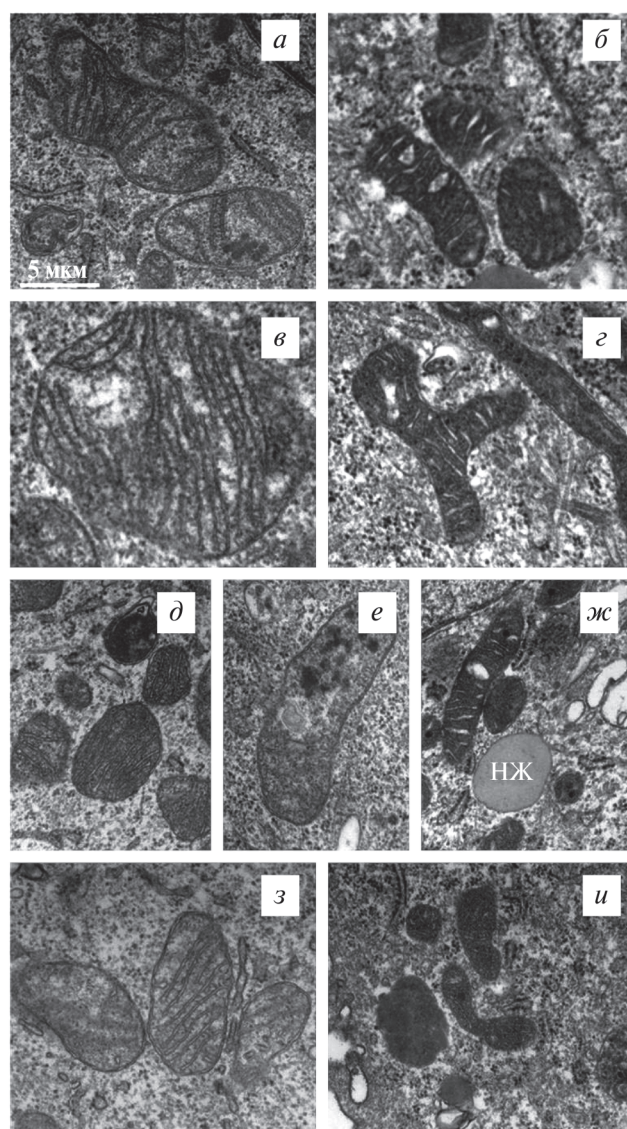


Рис. 4. Ультраструктура митохондрий в клетках HaCaT в контроле (*а, б*) и после действия СВЕ в течение 48 ч в концентрации 40 (*в, г*), 60 (*д–ж*) и 100 (*з–и*) мкМ; нж – липидные включения (нейтральный жир).

образования АФК и апоптоз по митохондриальному механизму (Савицкая и др., 2012). В нынешней работе исследовано влияние СВЕ на митохондрии в клеточной линии HaCaT.

В клетках HaCaT митохондрии визуализировали с помощью прижизненного окрашивания потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange. Оказалось, что клетки в контроле имеют многочисленные мелкие митохондрии, форма которых чаще всего удлинённая (рис. 3а). После воздействия 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч значительных изменений морфологии митохондрий не выявляли (рис. 3б). Примечательно, что более

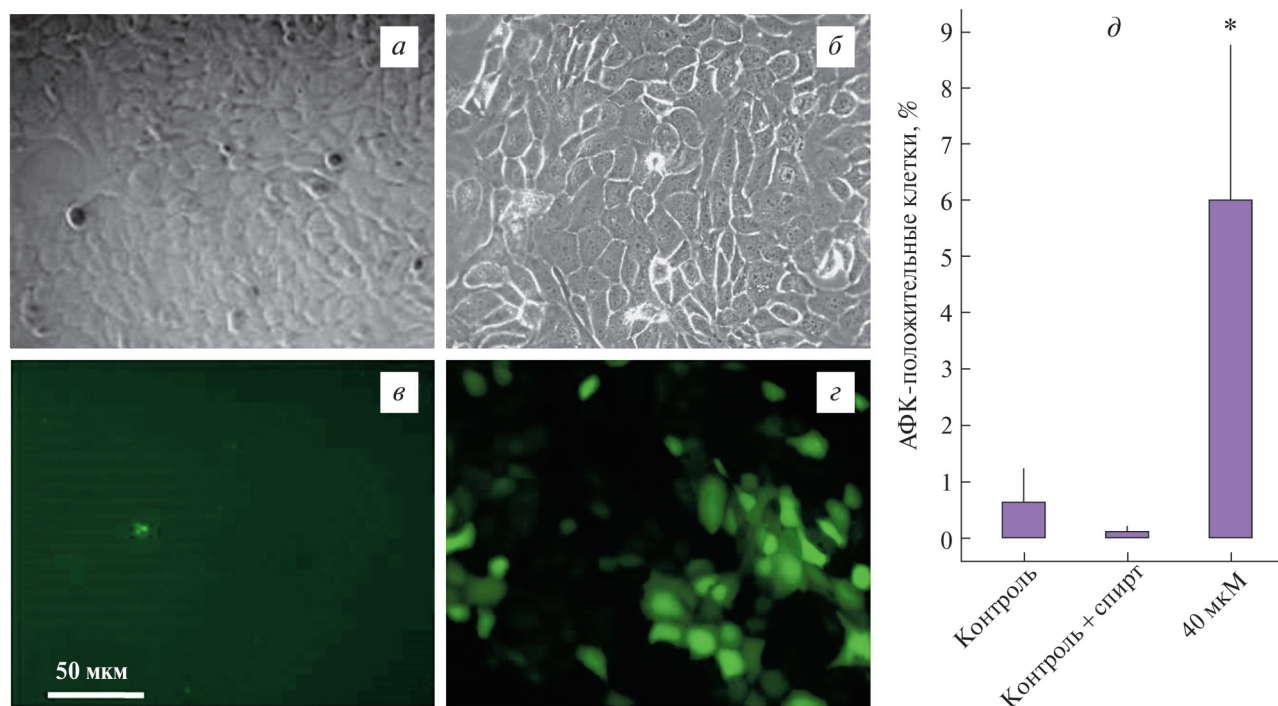


Рис. 5. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках HaCaT в контроле (а, в) и после действия 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч (б, г); фазовый контраст (а, б) и окрашивание с помощью зонда DCFH-DA (в, г); д — доля АФК-положительных клеток после культивирования при наличии СВЕ. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна—Уитни, различие с контролем с добавлением спирта, достоверно при (*) $P < 0.05$ ($n = 3$).

высокие концентрации СВЕ, а именно 60 мкМ (рис. 3в) и 100 мкМ (рис. 3г) также не оказывают существенного влияния на морфологию и распределение митохондрий в клетке.

Иммуноцитохимическое выявление белка цитохрома *c* (рис. 3д–и) демонстрирует, что в результате инкубации клеток HaCaT в присутствии 40 мкМ СВЕ не происходит выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль (рис. 3ж). В пользу этого говорит также отсутствие изменения формы и размера митохондрий, выявляемых при окрашивании митотрекером. Таким образом, воздействие 40 мкМ СВЕ на протяжении 48 ч не приводит к изменениям структуры хондриома и выходу цитохрома *c*. Более высокие концентрации СВЕ — 60 и 100 мкМ — также не индуцируют выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль клеток HaCaT (рис. 3з, и).

Для оценки влияния СВЕ на изменения ультраструктуры митохондрий, которые не выявляются на световом уровне, использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На ультратонких срезах митохондрии клеток в контроле обычно выглядят как небольшие овальные структуры со светлым матриксом и тонкими кристами. У некоторых митохондрий в матриксе

могут встречаться отдельные электронно-плотные области (рис. 4а). Иногда встречаются митохондрии с уплотненным матриксом; у них может быть расширено внутреннее пространство крист (рис. 4б). При воздействии СВЕ во всех изученных концентрациях наблюдается похожая картина (рис. 4в–и).

Стоит отметить гетерогенность популяции митохондрий как в контроле, так и при всех изученных воздействиях: в одной и той же клетке могли встречаться митохондрии с немного различной ультраструктурой; при этом значительных ультраструктурных изменений митохондрий в клетках после действия СВЕ по сравнению с контрольными клетками не выявили.

СВЕ вызывает усиление продукции АФК в клетках HaCaT. Чтобы выяснить, вызывает ли СВЕ повышение уровня кислородных радикалов, прижизненно окрашивали клетки красителем DCFH-DA. Оказалось, что количество окрашенных клеток после воздействия СВЕ значительно превышает таковое в контроле (рис. 5). Согласно результатам подсчета, доля клеток HaCaT с гиперпродукцией АФК существенно возрастает, подобно тому, что было показано для клеток A431 (Савицкая и др., 2012).

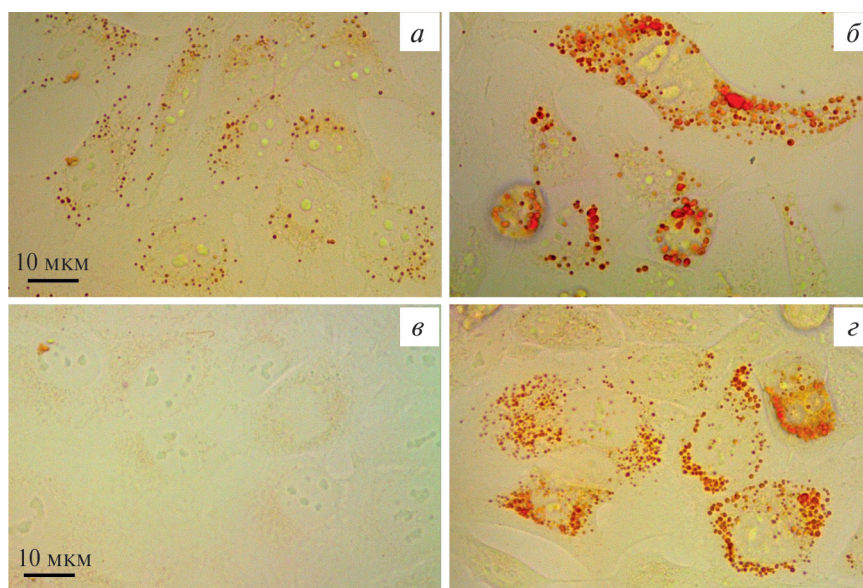


Рис. 6. Выявление нейтрального жира в клетках A431 (а, б) и HaCaT (в, г) после культивирования в контроле (а, в) и в присутствии 40 мкМ СВЕ (б, г).

СВЕ вызывает накопление липидных включений в цитоплазме. Известно, что при ряде стрессовых воздействий в цитоплазме клеток увеличивается содержание жировых включений; так, накопление липидных капель показано при индукции апоптоза, в частности по митохондриальному механизму (Boren, Brindle, 2012). Для их выявления при действии СВЕ проводили окрашивание суданом III.

В клетках A431 при действии 40 мкМ СВЕ количество жировых капель в цитоплазме заметно возрастало по сравнению с контролем, часто наблюдали и увеличение размера отдельных включений (рис. 6а, б).

Подобную картину наблюдали и для клеток линии HaCaT. Тем не менее стоит отметить, что в контроле в клетках HaCaT липидных капель гораздо меньше, чем в клетках A431, и они практически незаметны (см. рис. 5в, г). Жировые капли в цитоплазме клеток, подвергавшихся воздействию СВЕ, видны и на ультраструктурном уровне (рис. 7к–м).

СВЕ вызывает изменение структуры гранулярного ЭПР и аппарата Гольджи в клетках A431 и HaCaT. Гранулярный ЭПР (грЭПР) в клетках A431 в контроле на ультраструктурном уровне представляет собой удлиненные каналы, на мембранах которых расположены полирибосомы (рис. 7а–в). В клетках, подвергавшихся воздействию СВЕ, встречаются как каналы грЭПР, по ультраструктуре сходные с таковыми в контроле (рис. 7г), так и значительно отличающиеся от контрольных (рис. 7д–е). Так, могут появляться протяженные участки, на мембранах которых отсутствуют ри-

босомы; встречаются и локальные расширения каналов ЭПР (рис. 7, показаны стрелками).

Обнаруженные изменения состояния ЭПР могут служить признаками его стресса (Sriburi et al., 2004; Vommiasamy et al., 2009). Известно, что стресс грЭПР может сопровождаться стрессом аппарата Гольджи (Wlodkowic et al., 2009). На световом уровне аппарат Гольджи выявляли методом иммуноцитохимического окрашивания антителами к матриксному белку p58K (рис. 8). Оказалось, что в контроле аппарат Гольджи лежит вблизи ядра клетки в виде протяженных областей. В клетках A431 после действия СВЕ аппарат Гольджи образует достаточно мелкие компактные кластеры, которые также располагаются около ядра.

Изменения аппарата Гольджи в клетках A431 выявляются не только на световом, но и на ультраструктурном уровне. Так, в контроле (рис. 9а) аппарат Гольджи имеет типичный вид стопки плоских цистерн с ампулярными расширениями на краях. В клетках, культивированных в присутствии СВЕ (рис. 9б, г, д), цистерны аппарата Гольджи значительно расширяются; такое расширение затрагивает как цис-, так и медиальные и транс-части. Форма цистерн может становиться овальной, а окружающие их везикулы — увеличиваться в размерах.

В клетках линии HaCaT в контроле грЭПР выглядит практически так же, как в клетках A431, но в отличие от них, такая морфология сохраняется и при воздействии 40 мкМ СВЕ; изредка встречаются расширенные цистерны.

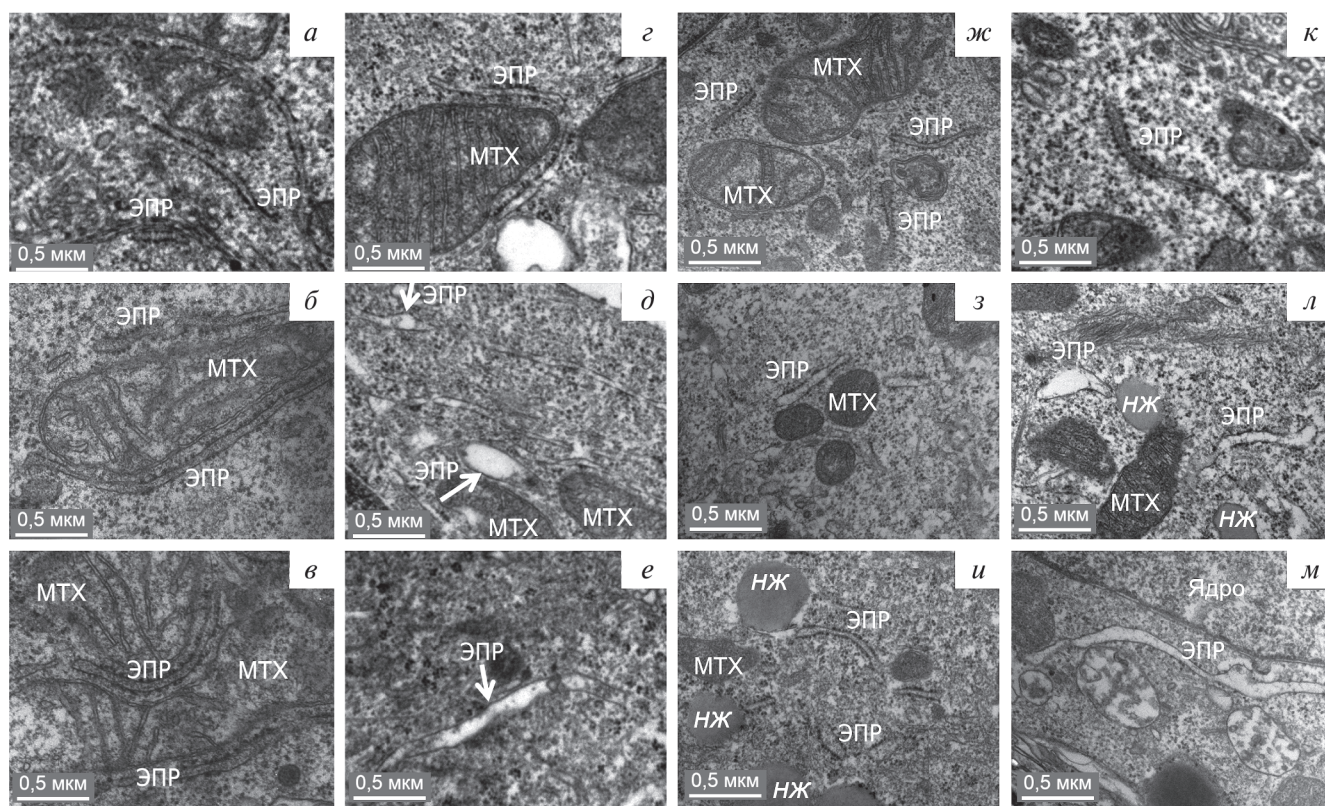


Рис. 7. Ультраструктура гранулярного ЭПР в клетках A431 (*a–e*) и HaCaT (*ж–м*) в контроле и после 48-часового воздействия СВЕ. Клетки A431: *a* – контроль; *б, в* – контроль с добавлением спирта; *г–е* – 40 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT: *ж* – контроль, *з* – 40 мкМ СВЕ, *и, к* – 60 мкМ СВЕ, *л, м* – 100 мкМ СВЕ. Обозначения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум, МТХ – митохондрии, НЖ – липидные капли (нейтральный жир).

При действии 60 или 100 мкМ СВЕ в клетках HaCaT появляются участки гранулярного ЭПР со значительными расширениями (см. рис. 7*к, м*). Наиболее выражено расширение каналов ЭПР в клетках после культивирования в присутствии 100 мкМ СВЕ (см. рис. 7*м*).

Визуализация аппарата Гольджи в клетках HaCaT с помощью иммуноцитохимического выявления белка p58K (см. рис. 8*в–е*) показала, что в контроле и после воздействия 40 мкМ СВЕ картина практически одинакова и соответствует той, которая наблюдается в контроле в культуре клеток A431. В результате культивирования клеток в присутствии 60 или 100 мкМ СВЕ аппарат Гольджи становится более компактным и формирует кластеры вблизи ядра подобно тем, которые появляются в клетках A431 уже при действии 40 мкМ СВЕ. Таким образом, в клетках линии HaCaT изменения формы аппарата Гольджи при действии СВЕ сходны с таковыми в линии A431, но требуют более высоких концентраций агента (см. рис. 8*д, е*).

Ультраструктура аппарата Гольджи в клетках HaCaT может различаться как внутри од-

ной клетки, так и между различными клетками при одних и тех же условиях культивирования. Так, в контроле наряду со стопками плоских цистерн (см. рис. 9*з*) встречаются стопки, в которых расширены некоторые (см. рис. 9*и*) или практически все (см. рис. 9*к*) цистерны. Последние два варианта ультраструктуры встречаются на срезах относительно редко. После воздействия СВЕ на клетки HaCaT в целом обнаруживается сходная картина. При более высоких концентрациях агента расширенные цистерны аппарата Гольджи присутствуют практически во всех стопках (рис. 9*н, о*).

СВЕ повышает уровни экспрессии маркеров стресса ЭПР. Для того, чтобы выяснить, оказывает ли СВЕ влияние на уровень экспрессии генов маркеров стресса ЭПР, была проведена ПЦР-РВ. В обеих исследуемых линиях оценивали экспрессию маркеров стресса ЭПР GRP78, ATF4 и CHOP. Было обнаружено, что при воздействии 40 мкМ СВЕ в клетках линии A431 происходит статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК GRP78 и ATF4 в 51 и 28 раз соответственно, а в клетках линии HaCaT – повышение уровня экспрессии ATF4 и CHOP в 10 и

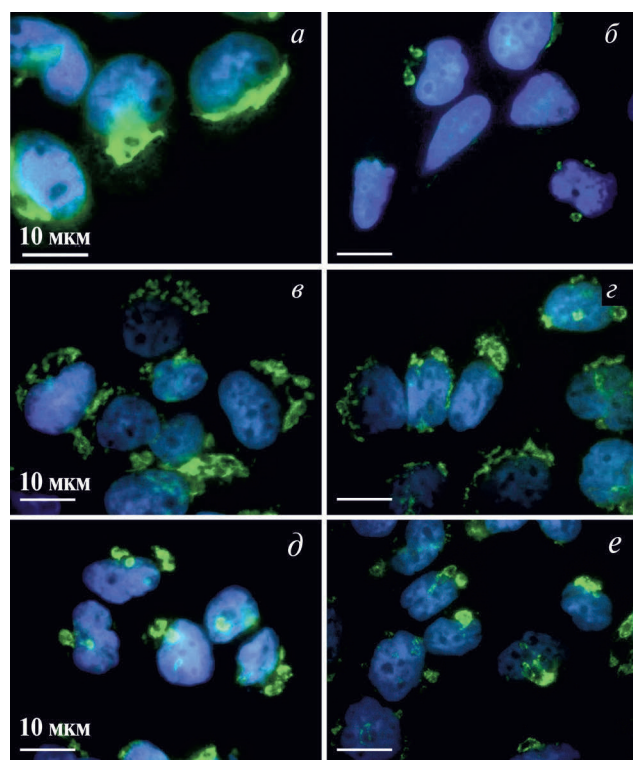


Рис. 8. Иммуноцитохимическое выявление белка p58k в составе аппарата Гольджи в клетках A431 (а, б) и NaCaT (в–е) в контроле и после 48-часового действия СВЕ. Клетки A431: а – контроль, б – 40 мкМ СВЕ. Клетки NaCaT: в – контроль, з – 40 мкМ СВЕ, д – 60 мкМ СВЕ, е – 100 мкМ СВЕ.

22 раза соответственно. Наблюдается тенденция к повышению уровня экспрессии GRP78 в клетках NaCaT и СНОР в клетках A431, однако оно не является статистически значимым (рис. 10).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сукцинат витамина Е способен избирательно вызывать апоптоз в опухолевых клетках, вследствие чего его можно рассматривать в качестве потенциального противоопухолевого агента. Тем не менее данных о механизме его действия на клетки в настоящее время недостаточно; при этом обычно каждое отдельно взятое исследование посвящено лишь одному или небольшому числу реакций клетки (Weber et al., 2003; Yu et al., 2003; Wang et al., 2005; Neuzil et al., 2007; Dong et al., 2008; Zhao et al., 2009; Prochazka et al., 2010; dos Santos et al., 2012; Савицкая и др., 2012; Gruber et al., 2014).

Одни авторы демонстрируют, что клеточная гибель сопровождается нарушением проницаемости мембран лизосом (Neuzil et al., 2002), другие описывают запуск апоптоза по митохондриальному механизму (Dong et al., 2008; Zhao et al.,

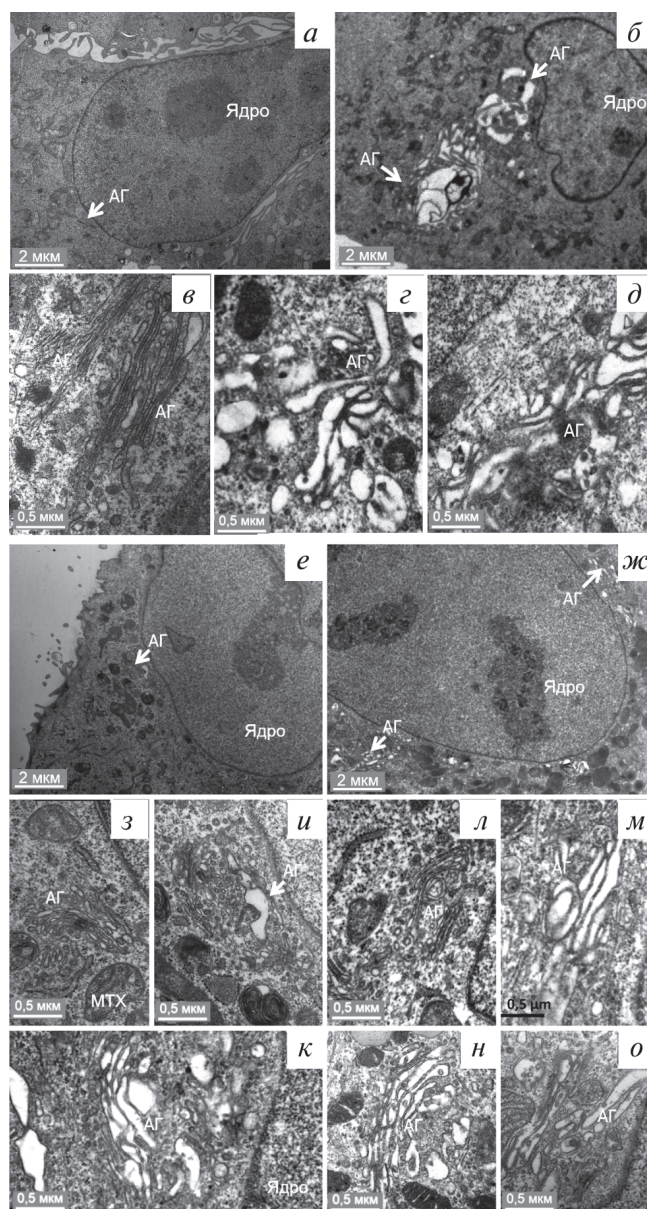


Рис. 9. Ультраструктура аппарата Гольджи в клетках A431 (а–д) и NaCaT (е–о) в контроле и после 48-часового действия СВЕ. Клетки A431: а, в – контроль; б, з, д – 40 мкМ СВЕ. Клетки NaCaT: е, з, и, к – контроль; ж, н – 60 мкМ СВЕ; л, м – 40 мкМ СВЕ; о – 100 мкМ СВЕ. Обозначения: АГ – аппарат Гольджи, МТХ – митохондрии.

2009; Prochazka et al., 2010; dos Santos et al., 2012; Gruber et al., 2014). Также стоит отметить, что лишь немногочисленные данные литературы посвящены действию СВЕ на нормальные/нетуморогенные клетки, которые в большинстве случаев демонстрируют селективность эффекта СВЕ (Israel et al., 2000; Neuzil et al., 2001; Zhao et al., 2009; Majima et al., 2019).

Таким образом, в настоящее время нет полной картины влияния СВЕ на нормальные/нетуморо-

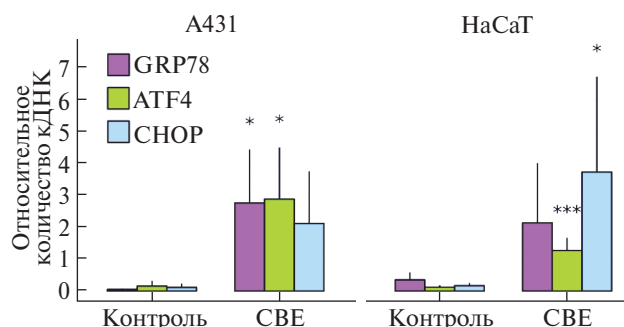


Рис. 10. Относительная экспрессия генов-маркеров стресса ЭПР: *GRP78*, *ATF4* и *CHOP* в клетках линий A431 и HaCaT при воздействии 40 мкМ СВЕ. ПЦР в реальном времени. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна–Уитни; различия с контролем достоверны при (*) $P < 0.05$ или (***) $P < 0.001$ ($n = 3$).

генные клетки и не изучены механизмы, общие для нормальных и опухолевых клеток. Отсутствует также подробное исследование особенностей гибели клеток разного происхождения, в частности клеток многослойных плоских эпителиев, образующих кожные покровы и эпителиальные выстилки ряда слизистых оболочек.

В более ранней работе (Савицкая и др., 2012) показано, что СВЕ вызывает снижение жизнеспособности и апоптотическую гибель клеток эпидермоидной карциномы A431 по сравнению с контролем; при этом эффект зависит от концентрации агента и времени воздействия. В иммортализованных нетуморогенных кератиноцитах HaCaT СВЕ также вызывает снижение жизнеспособности клеток, и выраженность эффекта зависит от времени воздействия и концентрации вещества. Индукция апоптоза в клетках HaCaT показана с помощью подсчета АИ на препаратах клеток, окрашенных гематоксилином и эозином. Примечательно, что хотя СВЕ, как и в клетках A431, вызывает значимое повышение АИ через 48 ч после внесения агента, даже при 60 и 100 мкМ СВЕ величина АИ не превышает 4%.

При использовании метода МТТ значимые различия жизнеспособности клеток выявляются при культивировании в присутствии 40, 60 и 100 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT более устойчивы к снижению жизнеспособности при действии СВЕ в концентрации 60 и 100 мкМ по сравнению с клетками эпидермоидной карциномы A431. Такие данные согласуются с результатами исследований, свидетельствующих о селективном действии СВЕ по отношению к опухолевым клеткам (Israel et al., 2000; Neuzil et al., 2001; Zhao et al., 2009).

Ранее было показано, что в клетках A431 СВЕ способствует запуску апоптоза по митохондриальному пути (Савицкая и др., 2012). Поэтому в настоящей работе клетки линии HaCaT исследовали по тем же параметрам, что и A431. Выявление АФК продемонстрировало, что даже при действии 40 мкМ СВЕ доля окрашенных на АФК клеток значительно возрастает, как и в клетках A431. Однако АИ в линии клеток HaCaT значительно ниже, чем в линии A431 при таком же воздействии. В качестве объяснения этого наблюдения можно предположить активацию характерной для нормальных клеток мощной системы антиоксидантной защиты (Kogure et al., 2002; Neuzil et al., 2007).

Далее в клетках HaCaT, подвергнутых действию СВЕ в концентрации 40, 60 и 100 мкМ, прижизненно окрашивали митохондрии клеток, выявляли цитохром с методом иммуноцитохимии, а также исследовали состояние митохондрий на ультраструктурном уровне. Было обнаружено, что по сравнению с контролем СВЕ в концентрации до 100 мкМ включительно существенно не влияет ни на форму, ни на размер митохондрий как на светомикроскопическом, так и на ультраструктурном уровне. Оказалось также, что цитохром с сохраняется в составе митохондрий даже в тех клетках, у которых присутствуют морфологические признаки апоптоза, такие как блеббинг.

Таким образом, клетки HaCaT проявляют устойчивость к СВЕ в концентрации 40 мкМ; более высокие концентрации хоть и вызывают апоптотическую гибель, но происходит она по механизму, отличному от митохондриального. Чтобы оценить вклад других органелл и компонентов клетки в развитие гибели, мы изучали ЭПР, аппарат Гольджи и накопление липидных капель.

С помощью окрашивания, позволяющего на световом уровне визуализировать нейтральный жир, нами было показано, что при действии СВЕ в клетках как линии A431, так и HaCaT, увеличиваются количество и размеры липидных капель в цитоплазме. Накопление липидных капель в целом характерно для апоптоза (Boren, Brindle, 2012). Оно может быть связано с усилением синтеза липидов *de novo*, которое происходит вследствие подавления β -окисления жирных кислот в митохондриях, в результате чего жирные кислоты используются для синтеза липидов.

В свою очередь, ингибирование β -окисления может быть следствием повышения уровня АФК, поскольку кислородные радикалы инактивируют соответствующие ферменты, реагируя с их тиоль-

ными группами (Boren, Brindle, 2012). В литературе можно встретить и другие объяснения накопления липидных капель в апоптотических клетках: перераспределение различных видов липидов между разными компартментами клетки (Quintero et al., 2010), повышение количества липидов вследствие деградации органелл и аутофагии (Delikatny et al., 2002) или усиления активности фосфолипазы A2 (Nakumaki et al., 1999).

Известно, что накопление липидных капель может происходить вследствие стресса ЭПР, и наоборот – стресс ЭПР способен возникать в результате накопления липидов в цитоплазме. Нарушение обновления липидных капель также может вызвать стресс ЭПР (Napala et al., 2011; Jarc, Petan, 2019). Для объяснения роли воздействия СВЕ в увеличении количества липидных включений необходимо более детальное изучение нарушения метаболизма липидов при стрессе ЭПР в нормальных и опухолевых клетках разного происхождения.

Поскольку разные пути апоптоза нередко могут пересекаться, затрагивая различные органеллы (Yang et al., 2018; Gao et al., 2021; Qiu et al., 2021), мы также исследовали состояние органелл синтетического компартмента, чтобы оценить их участие и изменение в процессе индукции клеточной гибели как в клетках A431, так и HaCaT.

Анализ аппарата Гольджи на светомикроскопическом и ультраструктурном уровнях показал, что в клетках A431 при концентрации СВЕ 40 мкМ аппарат Гольджи кластеризуется на световом уровне, а на ультраструктурном может наблюдаться расширение цистерн. При этом с помощью трансмиссионной электронной микроскопии мы также выявили расширение каналов ЭПР. В клетках линии HaCaT эффекты сходны с таковыми для A431, но встречаются при концентрациях СВЕ 60 и 100 мкМ. Интересно отметить, что повышенная устойчивость клеток HaCaT к структурным изменениям их синтетического компартмента под воздействием СВЕ сопровождается меньшим снижением жизнеспособности клеток.

Известно, что расширение каналов грЭПР может сопровождать состояние его стресса (Sriburi et al., 2004; Vommiasamy et al., 2009). Стресс ЭПР был подтвержден с помощью ПЦР-РВ, которая показала усиление экспрессии по крайней мере двух молекулярных маркеров стресса ЭПР из трех, проанализированных для каждой культуры клеток.

Апоптоз, вызываемый стрессом ЭПР, чаще всего реализуется по митохондриальному механиз-

му (Gorman et al., 2012). В частности, большую роль при этом может играть концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле. После выхода из ЭПР в результате стресса Ca^{2+} поступает в митохондрии, где может нарушать работу комплексов дыхательной цепи и приводить к гиперпродукции АФК (Napala et al., 2011).

Однако есть отдельные редкие данные, указывающие на то, что переключение на митохондриальный механизм происходит не всегда, и в этом случае в процессе апоптоза могут участвовать не только каспаза 9, но и каспазы 4 и 12 (у мышей) и даже 8, однако эти данные скудны и неоднозначны (Hitomi et al., 2004; Gorman et al., 2012). Тем не менее можно предположить, что в клетках HaCaT апоптоз индуцируется при участии стресса ЭПР, не затрагивая митохондрии, поскольку мы не обнаружили ни морфологических изменений митохондрий, ни, что более важно, выхода в цитозоль цитохрома *c*.

О различиях механизмов индукции апоптоза при действии СВЕ на нормальные и опухолевые клетки могут говорить и данные о тех сигнальных путях, которые активируются стрессом ЭПР в этих клеточных линиях. Поскольку мы показали, что именно в клетках HaCaT уровень экспрессии СНОР статистически значительно повышается, можно предположить, что этот белок вовлечен в индукцию программы апоптоза. Роль этого транскрипционного фактора в индукции апоптоза хорошо известна. СНОР опосредует клеточную гибель с помощью индукции экспрессии различных генов, включая *GADD34* и *ERO1 α* , которые могут способствовать апоптозу в условиях продолжительного стресса ЭПР (Verfaillie et al., 2013).

В настоящее время в литературе не описаны эффекты СВЕ или его аналогов по отношению к аппарату Гольджи. Выявленное в настоящей работе расширение его цистерн, возможно, представляет собой следствие индукции стресса ЭПР и активации программы апоптоза.

Таким образом, нами показано, что как в клетках A431, так и в клетках HaCaT при действии СВЕ индуцируется стресс ЭПР, происходят морфологические изменения структуры ЭПР и аппарата Гольджи, а также накапливаются липидные капли в цитоплазме, однако ключевое различие механизмов индукции апоптотической гибели в клетках A431 и HaCaT при действии СВЕ лежит в реакции митохондрий: в клетках A431 запуск апоптоза осуществляется по митохондриальному механизму, в то время как в линии HaCaT этого

не происходит, и клетки вступают в апоптоз без участия митохондрий. Поскольку СВЕ, как правило, в первую очередь направленно действует на митохондрии (Савицкая и др., 2016), можно предположить, что митохондриальный путь апоптоза в клетках A431 является основным и дополнительно усиливается стрессом ЭПР. Возможно, такое различие лежит в основе разной чувствительности клеток A431 и HaCaT к воздействию СВЕ.

Исследование воздействия СВЕ на нормальные и опухолевые клетки актуально как с теоретической, так и практической точки зрения. Изучение эффектов СВЕ по отношению к клеткам опухолей поможет лучше понять механизмы лежащих в их основе процессов, а в перспективе — разработать противоопухолевый препарат с селективным действием и минимальным количеством побочных эффектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств бюджета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (госзадание № 121032300098-5). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савицкая М.А., Вильданова М.С., Кисурина-Евгеньева О.П., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е. 2012. Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 при действии α-токоферилсукцината. *Acta Naturae*. Т. 4. С. 93. (Savitskaya M.A., Vildanova M.S., Kisurina-Evgeneva O.P., Smirnova E.A., Onischenko G.E. 2012. Mitochondrial pathway of α-tocopheryl succinate-induced apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Acta Naturae*. V. 4. P. 88.)
- Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. 2016. α-Токоферилсукцинат влияет на жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток. *Биохимия*. Т. 81. № 8. С. 1036. (Savitskaya M.A., Onischenko G.E. 2016. α-Tocopherylsuccinate affects malignant cell viability, proliferation, and differentiation. *Biochemistry (Moscow)*. V. 8. P. 806.)
- Badamchian M., Spangelo B.L., Bao Y., Hagiwara Y., Hagiwara H., Ueyama H., Goldstein A.L. 1994. Isolation of a vitamin E analog from a green barley leaf extract that stimulates release of prolactin and growth hormone from rat anterior pituitary cells in vitro. *J. NutrBiochem*. V. 5. P. 145. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)90086-8)
- Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R.G., Gluud C. 2004. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. V. 364. P. 1219.
- Bommiasamy H., Back S.H., Fagone P., Lee K., Meshinchi S., Vink E., Sriburi R., Frank M., Jackowski S., Kaufman R.J., Brewer J.W. 2009. ATF6-α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci*. V. 122. Pt. 10. P. 1626. <https://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Boren J., Brindle K.M. 2012. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ*. V. 19. P. 1561. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.34>
- Delikatny E.J., Cooper W.A., Brammah S., Sathasivam N., Rideout D.C. 2002. Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res*. V. 62. P. 1394.
- Dong L.F., Jameson V.J., Tilly D., Cerny J., Mahdavian E. 2011. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J. Biol. Chem*. V. 286. P. 3717.
- Dong L.F., Low P., Dyason J.C., Wang X.F., Prochazka L., Witting P.K., Freeman R., Swettenham E., Valis K., Liu J., Zabalova R., Turanek J., Spitz D.R., Domann F.E., Scheffler I.E., Ralph S.J., Neuzil J. 2008. Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene*. V. 27. P. 4324.
- Dos Santos G.A., Abreu e Lima R.S., Pestana C.R., Lima A.S., Scheucher P.S., Thomé C.H., Gímenes-Teixeira H.L., Santana-Lemos B.A., Lucena-Araujo A.R., Rodrigues F.P., Nasr R., Uyemura S.A., Falcão R.P., de Thé H., Pandolfi P.P. et al. 2012. (±)α-Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. *Leukemia*. V. 26. P. 451.
- Gao F.F., Quan J.H., Lee M.A., Ye W., Yuk J.M., Cha G.H., Choi I.W., Lee Y.H. 2021. Trichomonas vaginalis induces apoptosis via ROS and ER stress response through ER-mitochondria crosstalk in SiHa cells. *Parasit. Vectors*. V. 14. P. 603. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05098-2>
- Gorman A.M., Healy S.J., Jäger R., Samali A. 2012. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther*. V. 134. P. 306. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.02.003>
- Gruber J., Staniek K., Krewenka C., Moldzio R., Patel A., Böhmendorfer S., Rosenau T., Gille L. 2014. Tocopheramine succinate and tocopheryl succinate: mechanism of

- mitochondrial inhibition and superoxide radical production. *Bioorg. Med. Chem.* V. 22. P. 684.
- Hakumäki J.M., Poptani H., Sandmair A.M., Ylä-Herttuala S., Kauppinen R.A. 1999. ¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat. Med.* V. 5. P. 1323.
<https://doi.org/10.1038/15279>. PMID: 10546002
- Hapala I., Marza E., Ferreira T. 2011. Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol. Cell.* V. 103. P. 271.
<https://doi.org/10.1042/BC20100144>. PMID: 21729000
- Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., Kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imai-zumi K., Tsujimoto Y., Tohyama M. 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* V. 165. P. 347. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310015>
- Huang X., Li L., Zhang L., Zhang Z., Wang X., Zhang X., Hou L., Wu K. 2013. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in apoptosis induced by α -tocopheryl succinate in human gastric carcinoma cells. *Br. J. Nutr.* V. 109. P. 727.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001882>.
- Huang X., Zhang Z., Jia L., Zhao Y., Zhang X., Wu K. 2010. Endoplasmic reticulum stress contributes to vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Cancer Lett.* V. 296. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.002>
- Israel K., Yu W., Sanders B.G., Kline K. 2000. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutr. Cancer.* V. 36. P. 90.
- Jarc E., Petan T. 2019. Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale J. Biol. Med.* V. 92. P. 435.
- Kogure K., Hama S., Manabe S., Tokumura A., Fukuzawa K. 2002. High cytotoxicity of alphas-tocopherylhemisuccinate to cancer cells is due to failure of their antioxidative defense systems. *Cancer Lett.* V. 186. P. 151.
- Majima D., Mitsuhashi R., Fukuta T., Tanaka T., Kogure K. 2019. Biological functions of α -tocopheryl succinate. *J. Nutr. SciVitaminol.* V. 65. P. S104.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S104>. PMID: 31619606
- Neuzil J., Dyason J.C., Freeman R., Dong L.F., Prochazka L., Wang X.F., Scheffler I., Ralph S.J. 2007. Mitocans as anti-cancer agents targeting mitochondria: lessons from studies with vitamin E analogues, inhibitors of complex II. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 39. P. 65.
- Neuzil J., Weber T., Gellert N., Weber C. 2001. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *Br. J. Cancer.* V. 84. P. 87.
- Neuzil J., Zhao M., Ostermann G., Sticha M., Gellert N., Weber C., Eaton J.W., Brunk U.T. 2002. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumour activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. *Biochem. J.* V. 362. Pt. 3. P. 709.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620709>
- Potashnikova D., Gladkikh A., Vorobjev I.A. 2015. Selection of superior reference genes' combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas. *Ann. Clin. Lab.* V. 45. P. 64.
- Prochazka L., Dong L.F., Valis K., Freeman R., Ralph S.J., Turanek J., Neuzil J. 2010. alpha-Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels. *Apoptosis.* V. 15. P. 782.
- Qiu L.Z., Yue L.X., Ni Y.H., Zhou W., Huang C.S., Deng H.F., Wang N.N., Liu H., Liu X., Zhou Y.Q., Xiao C.R., Wang Y.G., Gao Y. 2021. Emodin-induced oxidative inhibition of mitochondrial function assists BiP/IRE1 α /CHOP signaling-mediated ER-related apoptosis. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2021. P. 8865813.
<https://doi.org/10.1155/2021/8865813>
- Quintero M., Cabañas M.E., Arús C. 2010. ¹³C-labelling studies indicate compartmentalized synthesis of triacylglycerols in C6 rat glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1801. P. 693. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2010.03.013>
- Rauchová H., Vokurková M., Drahotka Z. 2014. Inhibition of mitochondrial glycerol-3- phosphate dehydrogenase by α -tocopheryl succinate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* V. 53. P. 409.
- Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Gallardo-Perez J.C., Carreno-Fuentes L., Moreno-Sanchez R. 2009. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* V. 53. P. 29.
- Sriburi R., Jackowski S., Mori K., Brewer J.W. 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* V. 167. P. 35.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200406136>
- Verfaillie T., Garg A.D., Agostinis P. 2013. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Letters.* V. 332. P. 249.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.07.016>
- Wang X.F., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. 2005. Vitamin E analogs trigger apoptosis in HER2/erbB2-overexpressing breast cancer cells by signaling via the mitochondrial pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 326. P. 282.
- Weber T., Dalen H., Andera L., Nègre-Salvayre A., Augé N., Sticha M., Lloret A., Terman A., Witting P.K., Higuchi M., Plasilova M., Zivny J., Gellert N., Weber C., Neuzil J. 2003. Mitochondria play a central role in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate, an agent with antineoplastic activity: comparison with receptor-mediated pro-apoptotic signaling. *Biochemistry.* V. 42. P. 4277.
- Wlodkowic D., Skommer J., McGuinness D., Hillier C., Darzynkiewicz Z. 2009. ER-Golgi network – a future target for anti-cancer therapy. *Leuk Res.* V. 33. P. 1440.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.05.025>
- Yang Y., Wang G., Wu W., Yao S., Han X., He D., He J., Zheng G., Zhao Y., Cai Z., Yu R. 2018. Camalexin Induces apoptosis via the ROS-ER stress-mitochondrial apoptosis pathway in AML Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2018: 7426950. <https://doi.org/10.1155/2018/7426950>
- Yu W., Sanders B.G., Kline K. 2003. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* V. 63. P. 2483.
- Zhao Y., Neuzil J., Wu K. 2009. Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: from the bench to the bedside? *Mol. Nutr. Food Res.* V. 53. P. 129.

ALPHA-TOCOPHERYL SUCCINATE INDUCES ER STRESS, DISREGULATES LIPID METABOLISM AND LEADS TO APOPTOSIS IN NORMAL AND TUMOROUS CELL LINES OF EPIDERMAL ORIGIN

M. A. Savitskaya^a, I. I. Zakharov^a, A. A. Saidova^a, E. A. Smirnova^a, G. E. Onishchenko^{a, *}

^a *Lomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology, Moscow, 119234, Russia *e-mail: galina22@mail.ru*

Vitamin E succinate (VES, α -tocopheryl succinate), is a potential antitumor agent known to selectively affect the mitochondria of tumor cells. However, the data on the proapoptotic mechanism of action of VES are unclear, and the effect of VES on normal, non-tumorigenic cells has not been fully investigated. Previously, we showed that VES induces apoptosis via the mitochondrial pathway in A431 human epidermoid carcinoma cells. The goal of this work is to investigate the effect of VES on non-tumorigenic cells and to reveal commonalities and differences in pathways activated in normal and tumorous cells. To achieve this, we studied how VES affects such organelles as the ER and the Golgi apparatus, analyzed the expression of ER stress-associated genes, and also assessed the ROS content and the accumulation of lipid droplets in A431 human epidermoid carcinoma cells and HaCaT immortalized human keratinocytes. We show that in both cell lines there are signs of ER stress, the amount of ROS and lipid droplets increases, as does the number of apoptotic cells. At the same time, the key difference in the mechanisms apoptotic cell death induction in A431 and HaCaT cells treated with VES lies in the reaction of mitochondria: in A431 cells, apoptotic cell death is triggered via the mitochondrial pathway, while HaCaT cells initiate apoptosis without involving mitochondria. Thus, the targets of VES in normal and tumor cells may differ and can possibly complement each other during apoptosis induction.

Keywords: α -tocopheryl succinate, ER stress, apoptosis, lipid inclusions, ROS