

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-274

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ (2'-ДЕЗОКСИ)АДЕНОЗИНЫ  
И ФЕНОКСАЗИНЫ КАК ИНДУКТОРЫ АУТОФАГИИ\*****MODIFIED (2'-DEOXY)ADENOSINES AND PHENOXAZINE AS AUTOPHAGY INDUCERS**С. Я. Сокольская<sup>1</sup>, Б. П. Мясников<sup>2</sup>, Е. А. Гусева<sup>1,3,4</sup>, П. Н. Камзеева<sup>5</sup>, П. В. Сергиев<sup>1,3,4</sup>, А. В. Аралов<sup>5,6</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова<sup>2</sup>Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва<sup>4</sup>НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва<sup>5</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва<sup>6</sup>Российский университет дружбы народов, МоскваS. Y. Sokolskaya<sup>1</sup>, B. P. Myasnikov<sup>2</sup>, E. A. Guseva<sup>1,3,4</sup>, P. N. Kamzееva<sup>5</sup>, P. V. Sergiev<sup>1,3,4</sup>, A. V. Aralov<sup>5,6</sup><sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University<sup>2</sup>Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow<sup>3</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow<sup>4</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow<sup>5</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow<sup>6</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

✉ sofya.sokolskaya@yandex.ru

**Аннотация**

Активаторы аутофагии рассматриваются как перспективные молекулы для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Мы обнаружили шесть новых активаторов аутофагии среди двух классов молекул: производных (2'-дезоксид)аденозина и аналогов феноксазина. Эти соединения активируют аутофагию по АМПК-зависимому пути и превосходят по активности известный модулятор аутофагии — АИСАг.

**Abstract**

Autophagy inducers are regarded as a promising class of molecules with potential for use in the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. A total of six novel autophagy activators have been identified, belonging to two distinct chemical classes: 2'-deoxyadenosine derivatives and phenoxazine analogues. These compounds activate autophagy by the AMPK-dependent pathway, and exhibit greater activity than the known autophagy modulator AICAг.

Аутофагия — один из фундаментальных молекулярных процессов, служащих для удаления поврежденных компонентов клетки. В естественных условиях основными стимулами для активации аутофагии служат энергетическое и аминокислотное голодание, запускающие разветвленный каскад регуляции аутофагии, ключевым участником которого является АМР-зависимая протеинкиназа (АМПК).

Нарушение этого процесса приводит к нейродегенеративным заболеваниям [1] и ожирению [2]. Активация аутофагии с помощью фармакологических препаратов способствует улучшению состояния при инфаркте миокарда, различных видах кардиомиопатии и атеросклерозе [3]. Известным активатором аутофагии по АМПК-зависимому пути является АИСАг, однако он вызывает множество побочных эффектов [4].

Основная цель нашей работы — поиск новых активаторов аутофагии среди синтезированных химических аналогов АИСАг и исследование механизма их действия. В данном исследовании мы рассмотрели производные (2'-дезоксид)аденозина и феноксазиноподобных структур.

Для оценки способности исследуемых соединений активировать аутофагию мы использовали флуоресцентный клеточный репортерный анализ. В данной репортерной системе RFP (red fluorescent protein) диффузно распределен по клеточной цитоплазме, и аутофагия значимо не влияет на уровень его флуоресценции. GFP (green fluorescent protein) вместе с LC3 включается в аутофагосомы при активации аутофагии. При слиянии аутофаго-

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-539).

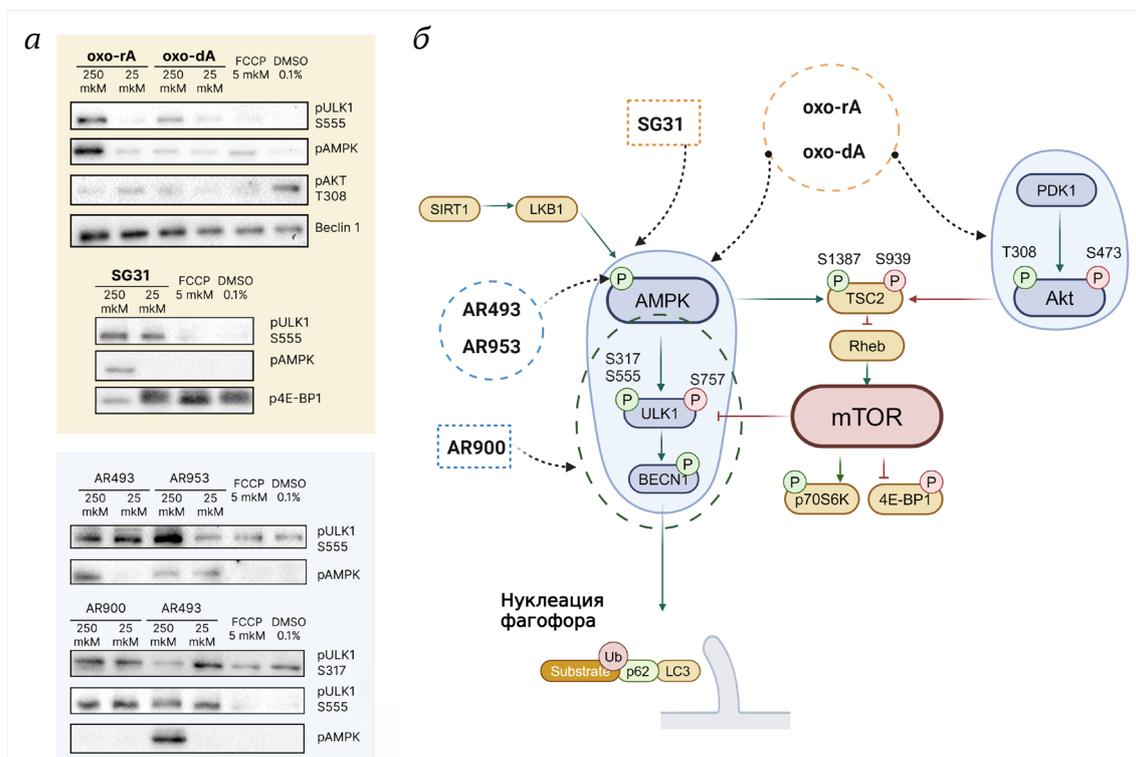
сомы и лизосомы снижается рН внутри везикулы, что приводит к уменьшению флуоресцентного сигнала GFP в клетке. Таким образом, сравнивая отношение красного и зеленого сигналов в клетках в различных условиях, можно сделать вывод об уровне активности аутофагии. Для соединений, обладающих наибольшей активностью, полученные результаты были подтверждены с помощью иммуноблоттинга на маркер аутофагии — белок LC3. Из каждой группы веществ были выбраны лучшие активаторы аутофагии (см. таблицу).

### Структуры лидерных соединений

Производные (2'-дезокси)аденозинов			Аналоги феноксазина		
охо-гА	охо-дА	SG31	AR493	AR953	AR900

Для определения механизма действия лидерных соединений мы проанализировали статус фосфорилирования основных участников каскада активации аутофагии. Мы показали, что соединения из обоих классов преимущественно активируют AMPK/ULK1-зависимый путь, так как их действие способствовало накоплению фосфорилированных форм (S555 и S317) основного субстрата AMPK — ULK1 (см. рисунок). При этом все соединения, кроме AR900, также вызвали значительное увеличение уровня фосфорилирования AMPK.

Помимо этого, производные (2'-дезокси)аденозина (охо-дА и охо-гА) вызвали снижение активирующего фосфорилирования АКТ (T308), а обработка клеток SG31 привела к снижению фосфорилирования ULK (Ser 757) и 4E-BP1, что косвенно свидетельствует об ингибировании mTOR — центрального регулятора аутофагии.



Изучение механизма действия лидерных соединений: *а* — изучение статуса фосфорилирования основных участников каскада активации аутофагии; *б* — схема предполагаемого механизма действия лидерных соединений

Для проверки специфичности действия молекул на АМПК-зависимый путь мы использовали клеточные линии, нокаутные по гену *АМПК* и его вышестоящего регулятора *SIRT1*. Инактивация данных генов значительно повлияла на активность AR493 и AR953, что подтверждает гипотезу о том, что основной механизм активации аутофагии для этих молекул — это АМПК-зависимый путь.

Таким образом, в ходе исследования мы обнаружили шесть новых активаторов аутофагии, действующих по АМПК-зависимому пути и превосходящих активность ранее описанного соединения АICAr более чем в 2 раза [5]. При этом два из выявленных активаторов аутофагии обладают значительной специфичностью действия по отношению к АМПК-зависимому пути.

### Литература

1. Mello de N. P., Orellana A. M., Mazucanti C. H. et al. Insulin and Autophagy in Neurodegeneration // *Front. Neurosci.* 2019. Vol. 13. P. 491.
2. Maiuolo J., Gliozzi M., Musolino V. et al. From Metabolic Syndrome to Neurological Diseases: Role of Autophagy // *Front Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 9. P. 651021.
3. Bravo-San Pedro J. M., Kroemer G., Galluzzi L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease // *Circ Res.* 2017. Vol. 120 (11). P. 1812–1824.
4. Višnjić D., Lalić H., Dembitz B., Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review // *Cells.* 2021. Vol. 10 (5). P. 1095.
5. Scudiero O., Nigro E., Monaco M. L. et al. New synthetic AICAR derivatives with enhanced AMPK and ACC activation // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2016. Vol. 31 (5). P. 748–753.