



УДК 577.161.3

© 2008

Член-корреспондент НАН України Г. В. Донченко, Г. В. Петрова

Роль α -токоферола и *N*-ацетил-*L*-цистеина в оксидативном стрессе, индуцированном менадионом

*It is established that α -tocopherol does not play the main role in the protection of rat thymocytes from damaging by menadione — generated superoxide that calls into question its ability to prevent oxidative stress. Efficiency of a predecessor of the glutathione synthesis, *N*-acetyl-*L*-cysteine, in the given model testifies to involving other antioxidative protection systems in this process.*

Оксидативный стресс, определяемый как “нарушение баланса между оксидантами и антиоксидантами в пользу первых” [1], является одним из основных индукторов гибели клетки. Повышенная продукция клеткой активных форм кислорода (АФК) приводит к потенциальной угрозе оксидативного повреждения биомолекул, однако в клетке существует многоуровневая система антиоксидантной защиты, включающая ферментативные и низкомолекулярные антиоксиданты [2]. Одним из жирорастворимых низкомолекулярных антиоксидантов традиционно считается витамин Е. Биологическое действие α -токоферола в основном связывают с его способностью предотвращать перекисное окисление липидов при развитии оксидативного стресса. Мнение о α -токофероле как антиоксиданте настолько устоялось в научной среде, что зачастую (обнаружив его ингибирующее действие на тот или иной процесс) исследователи априори делают вывод о связи этого процесса с повышенной продукцией АФК. Однако необходимо отметить, что теория антиоксидантного действия витамина Е в организме не является безупречной, а следовательно, и общепринятой. Свидетельство тому — значительное количество экспериментальных данных о существовании иных, помимо антиоксидантных, функций α -токоферола в клетке. Кроме того, недавнее появление в печати двух обзоров ведущих специалистов в области биохимии витамина Е, отстаивающих прямо противоположные точки зрения на механизмы биологического действия α -токоферола в организме [3, 4], безусловно, свидетельствует о том, что проблема далека от своего разрешения.

Цель настоящей работы — изучение влияния α -токоферола, его производных, не обладающих свойствами антиоксиданта — α -токоферилацетата и α -токоферилхинона, а также антиоксиданта *N*-ацетил-*L*-цистеина на выживаемость тимоцитов крысы и внутриклеточное содержание АФК при модуляции оксидативного стресса менадионом.

Материалы и методы исследований. Опыты проводили на белых крысах-самках массой 100–150 г. Аналогично методике, описанной ранее [5], были получены тимоциты, подсчитано количество клеток и определена их жизнеспособность с помощью красителя трипанового синего. Жизнеспособность свежевыделенных тимоцитов составляла не менее 97%. Около $2 \cdot 10^6$ клеток ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей 10 ммоль/л HEPES — NaOH буфер, pH 7,3, 0,1% БСА, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкмоль/л β -меркаптоэтанола. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 18 ч с исследуемыми соединениями в концентрациях, приведенных в тексте, после чего осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин) и отмывали 1 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), ммоль/л: NaCl 136,9; KCl 2,7; Na₂HPO₄ 8,1; KH₂PO₄ 1,5; pH 7,2.

Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ-тест) [6]. За 100% принимали количество формазана, образовавшегося в аликвоте свежевыделенных интактных тимоцитов.

Внутриклеточное образование супероксида оценивали с использованием флуоресцентного зонда ди гидроэтидия, который при взаимодействии с супероксидом дает два флуоресцирующих продукта [7]. Клетки $2 \cdot 10^6$ /мл культуральной среды инкубировали с 50 мкмоль/л ди гидроэтидием при 37 °С в течение часа, осаждали, дважды отмывали ЗФР. Уровень флуоресценции измеряли при длинах волн: возбуждения — 510 нм, эмиссии — 590 нм на спектрофлуориметре LS-50 (Perkin Elmer, Швейцария). Данные представлены как кратность увеличения (число раз) относительно контрольных тимоцитов.

Статистическая достоверность результатов оценивалась в программе SigmaPlot2000 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Менадион (витамин К₃, 2-метил-1,4-нафтохинон) вызывает оксидативный стресс за счет способности (в результате одноэлектронного восстановления) превращаться внутри клетки в радикал семихинона, который, в свою очередь, вступая в окислительно-восстановительный цикл с молекулярным кислородом, приводит к образованию АФК, в частности супероксида [8]. Кроме того, цитотоксическое действие менадиона может быть непосредственно связано с перекисным окислением липидов [9].

Как показано на рис 1, *врезка*, половина количества тимоцитов погибала при концентрации менадиона 20 мкмоль/л, а повышение концентрации до 100 мкмоль/л приводило к массовой гибели клеток. α -Токоферол повышал выживаемость клеток при действии менадиона в концентрации 20 мкмоль/л, однако жизнеспособность клеток увеличивалась не более чем на 10% (см. рис. 1). При концентрации менадиона 50 мкмоль/л и выше мы не обнаружили существенного эффекта α -токоферола (данные не представлены). Способность ингибировать цитотоксическое действие менадиона проявлял лишь α -токоферол, а α -токоферилацетат и особенно α -токоферилхинон, вызывали дополнительное увеличение гибели клеток. *N*-Ацетил-*L*-цистеин практически полностью восстанавливал жизнеспособность тимоцитов (см. рис. 1). Известно, что в результате деацетилирования внутри клетки *N*-ацетил-*L*-цистеин превращается в *L*-цистеин, стимулируя таким образом синтез антиоксиданта глутатиона. Кроме того, помимо свойств предшественника синтеза глутатиона, *N*-ацетил-*L*-цистеин *per se* обладает нуклеофильными и антиоксидантными свойствами [10].

Повышение содержания супероксида внутри клетки при концентрации менадиона 20 мкмоль/л составляло около 25%, однако при увеличении его концентраций до субтоксичных для тимоцитов уровень супероксида превышал базальный почти в 3 раза (рис. 2, *врезка*). Для индукции менадином гибели клеток достаточно повышение уровня АФК не более

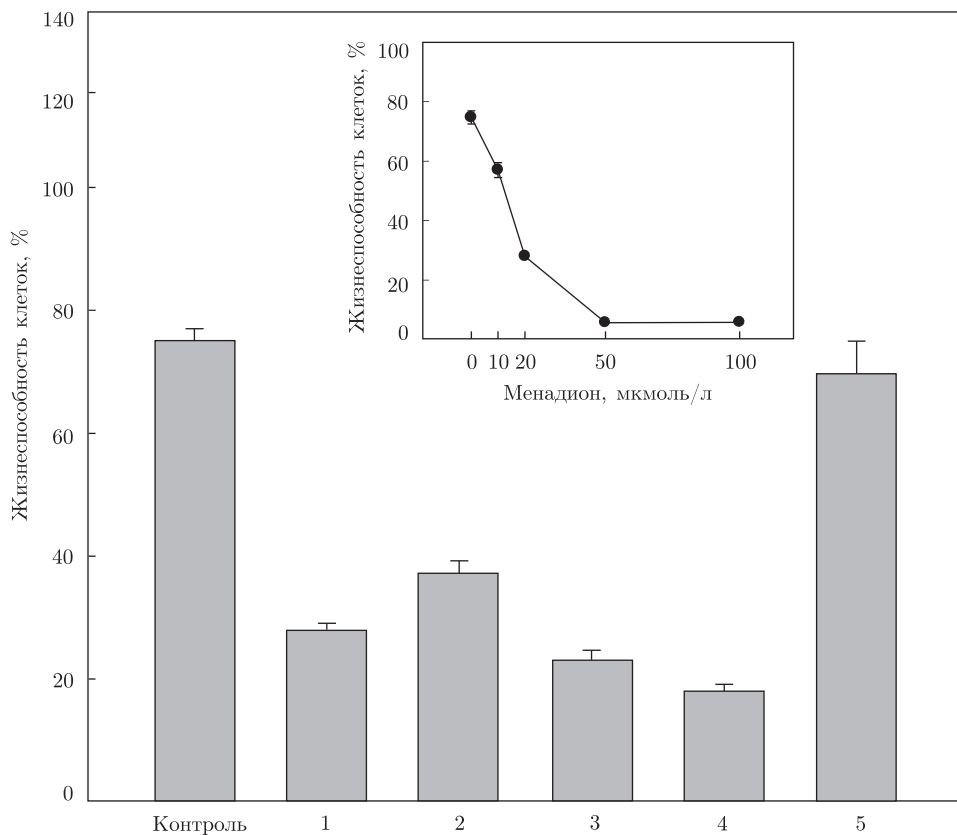


Рис. 1. Жизнеспособность тимоцитов крысы при инкубации с менадионом в различных концентрациях (врезка) и добавлении α -токоферола, его аналогов и *N*-ацетил-*L*-цистеина. Здесь и на рис. 2: 1 — менадион (20 мкмоль/л); 2 — α -токоферол (100 мкмоль/л); 3 — α -токоферилацетат (100 мкмоль/л); 4 — α -токоферилхинон (100 мкмоль/л); 5 — N -ацетил-*L*-цистеин (10 ммоль/л)

чем на 30%. *N*-Ацетил-*L*-цистеин полностью ингибировал, α -токоферол и α -токоферилацетат не изменяли, а α -токоферилхинон, напротив, достоверно увеличивал продукцию клеткой супероксида (см. рис. 2). Как показано нами ранее, α -токоферилхинон, образующийся в организме в результате двуэлектронного окисления α -токоферола, не токсичен для тимоцитов [5, 6]. Однако его аналог с укороченной до 6 атомов углерода боковой цепью обладает выраженными цитотоксическими свойствами [11]. Это обусловлено повышенной проницаемостью короткоцепочечных производных α -токоферола через плазматическую мембрану и накоплением их в клетке в концентрациях, достаточных для проявления цитотоксических свойств. Синергизм в действии менадиона и α -токоферилхинона может определяться сходством их химической структуры, поскольку оба они являются замещенными *n*-хинонами, имеющими боковые изопреноидные цепи. Кроме того, α -токоферилхинон, как и менадион, способен генерировать супероксид и синглетный кислород [12]. Поэтому даже небольшое увеличение количества α -токоферилхинона на фоне повышения продукции АФК химически сходными соединениями может приводить к усилению оксидативного повреждения клетки. Именно этим, очевидно, обусловлена потенциальная токсичность для организма высоких доз α -токоферола и наличие сложных механизмов его транспорта и метаболизма, направленных на поддержание относительно низких концентраций в клетке [13]. Сходные пути метаболизма для витаминов Е и К, а также активация ими экспрессии генов СУР 3А,

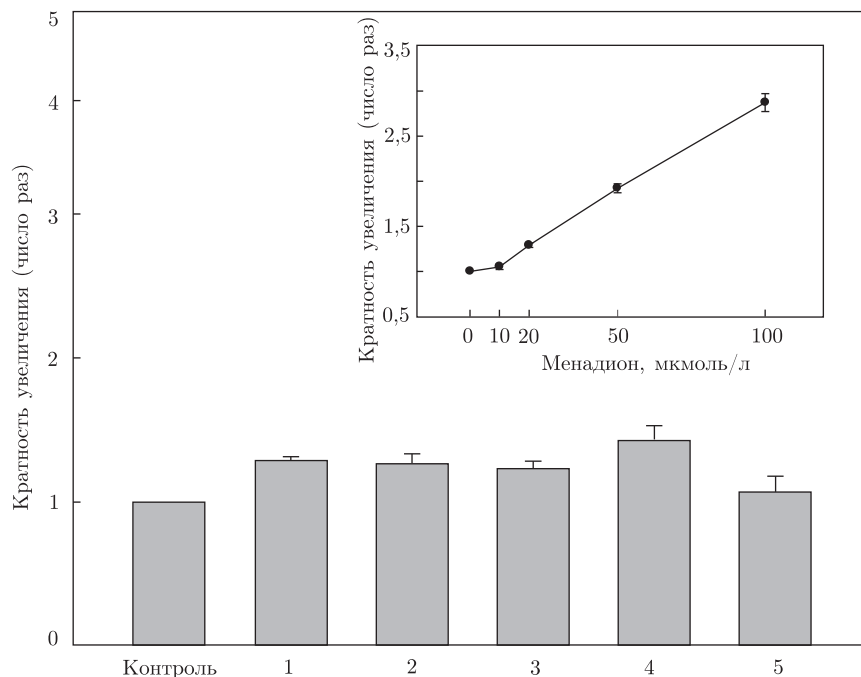


Рис. 2. Содержание супероксида в тимocyтах крысы при инкубации клеток с менадионом в различных концентрациях (врезка) и добавлении α -токоферола, его аналогов и *N*-ацетил-*L*-цистеина

ответственного за катаболизм ксенобиотиков [14], свидетельствует о возможности побочных эффектов при совместном введении этих витаминов.

Хотя α -токоферол защищал тимocyты от токсического действия менадиона, при этом не наблюдалось снижение количества внутриклеточного супероксида, что не подтверждает способность α -токоферола выступать в качестве антиоксиданта. Очевидно, что в данном случае его цитопротекторное действие обусловлено иной, более специфической биологической активностью. Отметим, что способность α -токоферола ингибировать цитотоксичность различных агентов связывают с активацией ним экспрессии генов, ответственных за синтез цитохрома P 450, что приводит к повышению катаболизма ксенобиотиков [15]. Однако такой механизм в большей степени свойственен клеткам печени, обладающим наиболее мощной системой детоксикации, и где происходят основные процессы, обеспечивающие биодоступность α -токоферола [13]. Вопрос о том, возможен ли такой механизм в клетках других тканей, остается открытым.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о том, что α -токоферол не играет основной роли в защите клеток от повреждающего действия, генерируемого менадионом супероксида, что ставит под сомнение его способность предотвращать окислительный стресс. Эффективность в данной модели предшественника глутатиона *N*-ацетил-*L*-цистеина свидетельствует о вовлечении в этот процесс других систем антиоксидантной защиты.

1. Sies H. What is oxidative stress? // Oxidative Stress and Vascular Disease. – Boston: Kluwer Acad., 2000. – P. 1–8.
2. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants // Cell. Signall. – 2007. – **19**, No 9. – P. 1807–1819.
3. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action // Free Rad. Biol. Med. – 2007. – **43**, No 1. – P. 16–21.

4. *Traber M. G., Atkinson J.* Vitamin E, antioxidant and nothing more // *Ibid.* – 2007. – **43**, No 1. – P. 4–15.
5. *Петрова Г. В., Капралов А. А., Донченко Г. В.* Сравнительное исследование действия токоферола, его синтетического производного и ионола на индуцированный дексаметазоном апоптоз тимоцитов крыс // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 1. – С. 78–84.
6. *Петрова Г. В., Донченко Г. В.* Влияние α -токоферола и его производных на апоптоз тимоцитов крыс, индуцированный актиномицином D // *Там само.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 102–107.
7. *Carter W. O., Narayanan P. K., Robinson J. P.* Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells // *J. Leukoc. Biol.* – 1994. – **55**, No 2. – P. 253–258.
8. *Monks T. J., Lau S. S.* Toxicology of quinone-thioethers // *Crit. Rev. Toxicol.* – 1992. – **22**, No 5./6. – P. 243–270.
9. *Chiou T. J., Chu S. T., Tzeng W. F.* Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation // *Toxicology.* – 2003. – **191**, No 2./3. – P. 77–88.
10. *De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F. et al.* Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points // *Carcinogenesis.* – 2001. – **22**, No 7. – P. 999–1013.
11. *Петрова Г. В., Донченко Г. В.* Цитотоксическое действие короткоцепочечных производных витамина E на тимоциты крысы // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 4. – С. 77–83.
12. *Crisostomo A. G., Moreno R. B., Navaratnam S. et al.* Generation of superoxide and singlet oxygen from alpha-tocopherolquinone and analogues // *Free Rad. Res.* – 2007. – **41**, No 6. – P. 730–737.
13. *Traber M. G.* Vitamin E regulatory mechanisms // *Ann. Rev. Nutr.* – 2007. – **27**. – P. 347–362.
14. *Landes N., Birringer M., Brigelius-Flohe R.* Homologous metabolic and gene activating routes for vitamins E and K // *Mol. Asp. Med.* – 2003. – **24**, No 6. – P. 337–344.
15. *Gonzalez R., Collado J. A., Nell S. et al.* Cytoprotective properties of alpha-tocopherol are related to gene regulation in cultured D-galactosamine-treated human hepatocytes // *Free Rad. Biol. Med.* – 2007. – **43**, No 10. – P. 1439–1452.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 21.12.2007