

УДК 577.15.612.438.

ГЕНЕРАЦІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ТИМОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА ФУЛЕРЕНУ C₆₀

© С. М. ГРЕБІНИК, І. І. ГРИНЮК, С. В. ПРИЛУЦЬКА,
О. П. МАТИШЕВСЬКА

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: grebник_z@yahoo.com

З використанням флуоресцентного зонда DCF оцінено динаміку продукування активних форм кисню (АФК) у тимоцитах упродовж 50 хв після дії 0,1 та 0,5 мМ H₂O₂. Встановлено залежне від концентрації оксиданту посилення продукування АФК, яке супроводжується підвищенням супероксиддисмутазної та глутатіонпероксидазної активності тимоцитів та зниженням їх життєздатності.

Передінкубація клітин з 10⁻⁵ фулереном C₆₀ приводила не лише до зниження продукування АФК у початковий період після дії H₂O₂, але й до підвищення життєздатності тимоцитів у віддаленіший термін часу після дії оксиданту. Одержані дані свідчать про здатність фулерену C₆₀ запобігати розвитку окисного стресу в тимоцитах.

Ключові слова: тимоцити, DCF, пероксид водню, АФК, фулерен C₆₀, життєздатність клітин, антиоксидантні ензими.

Підтримання клітиною прооксидантно-антиоксидантного балансу та відновлювального потенціалу є важливою умовою клітинного гомеостазу, а модифікація цих показників внаслідок посиленого продукування активних форм кисню (АФК) – одним із механізмів контролювання таких процесів як проліферація, затримка росту та клітинна загибель. Пероксид водню є відносно стабільним інтермедіатом із помірною оксидативною активністю, проте він здатен проникати крізь біологічні мембрани, дифундувати у внутрішньоклітинному просторі та ініціювати ланцюгові реакції утворення АФК. Завдяки системі антиоксидантного захисту внутрішньоклітинна концентрація H₂O₂ в нормі утримується на рівні 10⁻⁹–10⁻⁷ М. У зазначеному діапазоні концентрацій реалізується регуляторна дія H₂O₂, зокрема на активність сигнальних систем, що контролюють експресію генів. В основі такої дії лежать специфічні взаємодії H₂O₂ з чутливими до окислення тіолвмісними сайтами у складі молекул-сенсорів [1, 2]. У разі перевищення фізіологічного рівня H₂O₂ у клітині може відбуватись індукція апоптозу, спричинена не так впливом на метаболізм тіолів, як посиленням генерування АФК у внутрішньоклітинному просторі [2, 3].

На тимоцитах та Т-клітинах лінії Jurkat показано, що ознаки апоптозу, індукованого

пероксидом водню в діапазоні концентрацій 20–100 мкМ виявляються через декілька годин після його впливу, хоча клітини споживають доданий оксидант упродовж декількох хвилин [4, 5]. Для розуміння механізмів спрямування на шлях H₂O₂-залежного апоптозу та його запобігання важливою є оцінка таких показників, як кінетика продукування АФК у клітинах, активність ензимів, що відіграють першочергову роль у метаболізмі H₂O₂ всередині клітини – глутатіонзалежної пероксидази та супероксиддисмутази, – а також впливу на зазначені показники сполук, здатних виявляти антиоксидантну дію, зокрема представників вуглецевих наноструктур – фулеренів C₆₀. Наведене вище і зумовило мету цієї роботи.

Матеріали і методи

Тимоцити було ізольовано з тимусу щурів лінії Вістар обох статей з масою тіла 120–150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тимус перетирали через чотири шари нейлонової сітки в середовище RPMI або буфер такого складу (мМ): KCl – 5, NaCl – 120, CaCl₂ – 1, глюкоза – 10, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 4, Нерес – 10, рН 7,4. Кількість клітин підраховували під мікроскопом «ЛОМО» P12 (РФ) у камері Горяєва з використанням 0,4%-го розчину трипанового синього.

Вміст активних форм кисню визначали з використанням флуоресцентного зонда 2, 7 – дихлордигідрофлуоресцеїну діацетата (Sigma, США), який вносили безпосередньо в середовище інкубації клітин ($2 \cdot 10^6$ /мл) до кінцевої концентрації 5 мкМ у пробі. Інтенсивність флуоресценції зонда оцінювали в реальному часі на спектрофлуориметрі Shimadzu 150 RF (Японія), λ збудження – 480 нм, λ випромінювання – 520 нм [6].

Активність антиоксидантних ензимів визначали спектрофотометрично в клітинних екстрактах. Клітини ($0,5\text{--}2 \cdot 10^6$ /мл) осаджували центрифугуванням (600 г, 5 хв), переводили у 10 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,0), заморожували у скрапленому азоті. Після розморожування лізат обробляли в гомогенізаторі Поттера, і одержаний після його центрифугування (1500 г, 15 хв) супернатант (клітинний екстракт) використовували як ензимний препарат. Активність СОД визначали за здатністю ензиму інгібувати реакцію відновлення нітросинього тетразоліа (НСТ) [7], активність глутатіонпероксидази – за накопиченням окисленого глутатіону [8].

Життєздатність клітин оцінювали за швидкістю відновлення 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій броміду (МТТ) [9]. Для цього клітини після інкубації упродовж вказаного терміну переносили у 96-лункові планшети, кількість клітин у лунці становила $2 \cdot 10^5$ клітин/200 мкл. До кожної лунки додавали 20 мкл розчину МТТ (4 мг/мл) та інкубували протягом 2 год при 37 °С. Після інкубації планшети центрифугували (600 г, 7 хв). Осад формазану розчиняли у 100 мкл концентрованого розчину диметилсульфоксиду. Через 15 хв вимірювали абсорбцію проб при 570 нм на цифровому спектрофотометрі ІФКО–2 (АВОТЕК, Росія). Життєздатність клітин виражали у відсотках відносно контролю.

Стабільні водні колоїдні розчини фулеренів C_{60} (чистота > 99,5%, розмір кластерів наночастинок – 12–50 нм) одержано в хімічній лабораторії Технічного університету м. Ільменау (Німеччина) [10].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Розрахунки та побудову графіків виконували з використанням прикладних програм «Microsoft Excel 2003» та «Origin 7.0».

Результати та обговорення

Оцінка вмісту АФК у клітинах ґрунтується на здатності зонда DCFH-DA проникати крізь

плазматичну мембрану, деацильоватися за участю внутрішньоклітинних естераз з утворенням нефлуоресцентної форми DCFH, та за дії внутрішньоклітинних активних форм кисню (переважно гідроксильного радикала) окислюватись до DCF, якому властива флуоресценція [6, 11]. Тому характер зміни інтенсивності флуоресценції зонда у разі його внесення до суспензії тимоцитів (рис. 1, крива 1) відображає динаміку його входження всередину клітин та дозволяє оцінити необхідний для цього період часу (до 10 хв), а також визначити рівень АФК, ендогенно утворюваних у тимоцитах.

У підданих дії 100 мкМ H_2O_2 тимоцитах зафіксовано поступове посилення продуктування АФК, рівень яких через 50 хв не виходить на плато і вдвічі перевищує контрольний (рис. 1, крива 2). Дія пероксиду водню є концентраційнозалежною – у разі підвищення його концентрації до 500 мкМ значно зростає швидкість продуктування АФК, а їх рівень через 50 хв перевищує контрольний у 4 рази (рис. 1, крива 3). Одержані дані характеризують динаміку утворення АФК у тимоцитах за дії H_2O_2 , але не дають відповіді на питання щодо механізмів їх утворення. З'ясуванню цього питання може сприяти оцінка активності таких антиоксидантних ензимів, як глутатіонпероксидаза та СОД.

Ензимом, що перериває спричинені дією H_2O_2 ланцюгові реакції внутрішньоклітинного переокислення є глутатіонпероксидаза. Згідно з представленими на рис. 2 даними значну активацію цього ензиму, спрямовану на елімінацію надлишку H_2O_2 всередині клітини, виявлено вже через 30 хв після дії H_2O_2 . Через 1 год активність ензиму знижується, а через 3 год повертається до кон-

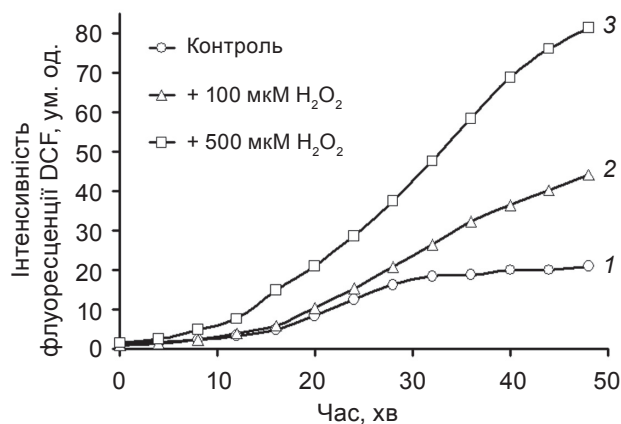


Рис. 1. Динаміка продуктування АФК у тимоцитах за дії H_2O_2

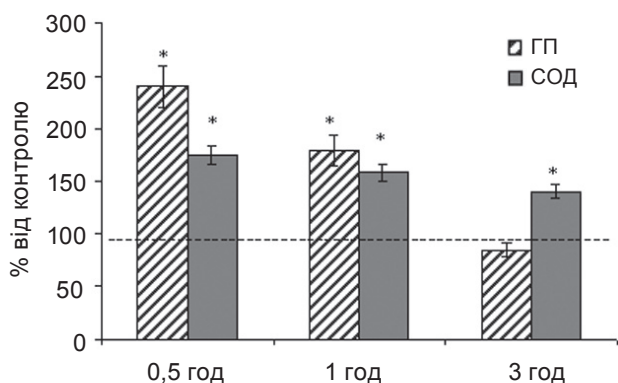


Рис. 2. Зміна супероксиддисмутази та глутатіонпероксидазної активності тимоцитів у динаміці після дії 100 мкМ пероксиду водню. * $P < 0,05$ порівняно з контролем. GP – глутатіонпероксидаза

трольного рівня. Проте виявлена динаміка зміни активності глутатіонпероксидази не є свідченням нормалізації оксидантної рівноваги в клітинах, оскільки підвищеною упродовж досліджуваного терміну після дії H_2O_2 залишається активність іншого антиоксидантного ензиму – СОД (рис. 2).

Тривала активація глутатіонпероксидази можлива за умови підтримання стабільного рівня внутрішньоклітинного GSH, який виконує роль не лише субстрату реакції, але й фактора, необхідного для відновлення розмішених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп. Як показано нами раніше, через 1 год після дії 100 мкМ H_2O_2 у тимоцитах вдвічі знижується вміст відновленого глутатіону [12]. Особливо чутливими до дії H_2O_2 є мітохондрії, які не містять каталази, а відновлюють оксидант завдяки наявності власного пулу GSH та активності глутатіонпероксидази. Збагачення мітохондрій Fe^{2+} сприяє відновленню H_2O_2 до H_2O в реакції Фентона з утворенням найагресивнішого з АФК – гідроксильного радикала $OH\cdot$. Внаслідок ушкоджувальної дії гідроксильного радикала посилюється витік електронів з комплексів I та III дихального ланцюга мітохондрій та накопичується продукт одноелектронного відновлення кисню – супероксиданіон, який нейтралізується супероксиддисмутазою до H_2O_2 – так формується замкнене коло генерації АФК [3, 13]. Супероксиддисмутаза є індукцибельним ензимом, тому виявлене підвищення його активності в тимоцитів є показником продукції O_2^- у досліджуваній період після дії H_2O_2 на клітини. Для розробки методів запобігання розвитку окисного стресу та апоптозу участь

різних форм АФК в цих процесах слід враховувати.

Відомо, що представники вуглецевих наноструктур – фулерени C_{60} – виявляють унікальні фізико-хімічні властивості. Завдяки сферичній формі, малим розмірам (0,72 нм у діаметрі) та гідрофобним властивостям молекула фулерену C_{60} може локалізуватись у клітинній мембрані та проникати всередину клітин, а через наявність кон'югованої системи подвійних міжвуглецевих зв'язків – взаємодіяти з вільними радикалами та нейтралізувати їх [14, 15]. Для з'ясування антиоксидантного ефекту фулерену C_{60} було оцінено його вплив (у кінцевій концентрації 10^{-5} М) на спричинену пероксидом водню генерацію АФК в тимоцитах. Для перевірки можливої безпосередньої взаємодії H_2O_2 з фулереном обидва чинники додавали до клітинної суспензії одночасно. За такої постановки експерименту динаміка генерування АФК була такою самою, як і за дії H_2O_2 (рис. 3, крива 3).

Згідно з даними літератури, час, необхідний для проникнення фулерену C_{60} та його похідних крізь плазматичну мембрану та накопичення всередині клітин різних типів коливається від 30 хв до 4 год [16]. У наших експериментах тимоцити були попередньо інкубовані з 10^{-5} М фулерену C_{60} упродовж 1 год, після чого їх піддавали дії H_2O_2 . За таких умов швидкість спричиненої H_2O_2 генерації АФК пригнічується, а їх рівень знижується (рис. 3, крива 4). Отже, фулерен C_{60} здатен втручатись у процес продукування АФК в тимоцитах, виявляючи антиоксидантний ефект або на рівні клітинної мембрани, або у цитоплазмі.

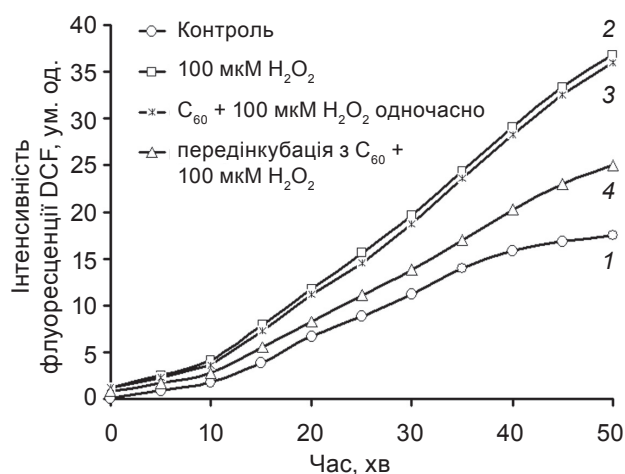


Рис. 3. Динаміка продукування АФК в тимоцитах за дії 100 мкМ H_2O_2 та 10^{-5} М фулерену C_{60}

Життєздатність тимоцитів (%) за дії пероксиду водню (100 мкМ) та фулерену C_{60} (10^{-5} M)

Умови експерименту	Термін інкубації, год	
	1	3
Контроль	100,0 ± 9,0	100,0 ± 9,5
<i>Із додаванням</i>		
H ₂ O ₂	72,0 ± 6,7*	57,0 ± 5,1*
H ₂ O ₂ та передінкубацією фулерену C ₆₀	95,0 ± 8,9**	78,0 ± 7,4**

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з дією H₂O₂

Як показано нами раніше, передінкубація тимоцитів із фулереном C_{60} не впливає на їхню супероксиддисмутазну та глутатіонпероксидазну активність [17], тому, представлені на рис. 3 дані свідчать про взаємодію наночастинок не з антиоксидантними ензимами, а з утворюваними АФК у клітині. Механізмами реалізації антиоксидантної дії фулерену може бути або безпосередня взаємодія супероксидного аніона та гідроксильного радикала із системою висококон'югованих подвійних зв'язків з утворенням радикала $C_{60}^{\cdot-}$ [18], або каталітична дисмутація супероксиданіона на поверхні наночастинок, що показано, зокрема, для мономалоніл-похідного C_{60} , яке розглядають як міметик супероксиддисмутазу [19].

Для перевірки того, чи здатен фулерен C_{60} впливати на життєздатність тимоцитів за дії H₂O₂ було використано МТТ-тест як показник активності мітохондріальних дегідрогеназ дихального ланцюга та загального функціонального стану мітохондрій. Швидкість реакції відновлення МТТ у клітинах оцінювали через 1 та 3 год після дії 100 мкМ H₂O₂. Пероксид водню достатньо швидко спричинював зниження життєздатності тимоцитів – вже через 1 год показник знижувався на 28% порівняно з контролем (таблиця), що узгоджується з даними про посилення продукування АФК упродовж цього терміну (рис. 2). Через 3 год після дії H₂O₂ спостерігається подальше зниження показника.

За попередньої обробки тимоцитів фулереном C_{60} їх життєздатність через 1 год після дії H₂O₂ відновлюється до контрольного рівня. Захисний ефект фулерену C_{60} виявлено і у віддаленіший термін – через 3 год, коли спостерігається значне підвищення життєздатності клітин (таблиця).

Ці дані свідчать про те, що у присутності фулерену C_{60} відбувається стабілізація мем-

бранного потенціалу мітохондрій та попередження цитотоксичної дії H₂O₂. Слід зазначити, що DCFH може окислюватись не лише АФК, але і гемвмісними протеїнами, зокрема цитохромом *c*, який вивільнюється з мітохондрій у цитоплазму внаслідок ушкоджувальної дії H₂O₂ [20]. Тому зонд DCFH можна розглядати, як ефективний і чутливий індикатор не лише продукування АФК, але і цитотоксичності.

Таким чином, з використанням флуоресцентного зонда DCF показано прискорення динаміки продукування АФК в тимоцитах упродовж першої години після дії 100 мкМ H₂O₂. Підвищення глутатіонпероксидазної та супероксиддисмутазної активності тимоцитів у цей період свідчить про роль O₂⁻ та пероксидів у розвитку окисного стресу. Передінкубація з фулереном C_{60} приводить до зниження продукування АФК та до зростання життєздатності оброблених пероксидом водню тимоцитів. Одержані дані дозволяють вважати перспективним використання фулерену C_{60} для запобігання патологічних станів, у розвитку яких важливу роль відіграє неконтрольоване продукування АФК.

Роботу виконано за підтримки гранту НАН України № 0110U005962.

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ТИМОЦИТАХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ФУЛЛЕРЕНА C_{60}

*С. Н. Гребиньк, И. И. Гринюк,
С. В. Прилуцкая, О. П. Матышевская*

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: grebnik_z@yahoo.com

С использованием зонда DCF дана оценка динамики генерации активных форм кислорода (АФК) в тимоцитах в течение 50 мин

после действия 0,1 и 0,5 мМ Н₂О₂. Показано зависимое от концентраций оксиданта усиление продукции АФК, которое сопровождается повышением супероксиддисмутазной и глутатионпероксидазной активности тимоцитов и снижением их жизнеспособности.

Прединкубация клеток с 10⁻⁵ М фуллереном С₆₀ приводит не только к снижению продукции АФК в начальный период после действия Н₂О₂, но и к повышению жизнеспособности тимоцитов в более отдаленный период.

Полученные данные свидетельствуют о способности фуллерена С₆₀ предотвращать развитие окислительного стресса в тимоцитах.

Ключевые слова: тимоциты, DCF, пероксид водорода, АФК, фуллерен С₆₀, жизнеспособность клеток, антиоксидантные энзимы.

GENERATION OF ACTIVE OXYGEN FORMS IN RAT TYMOCYTES UNDER ACTION OF HYDROGEN PEROXIDE AND FULLERENE C₆₀

*S. M. Grebinyk, I. I. Grynyuk,
S. V. Prylutska, O. P. Matyshevskya*

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: grebnik_z@yahoo.com

S u m m a r y

The dynamics of active oxygen forms (AOF) generation in rat thymocytes 50 min after treatment with 0.1 and 0.5 mM H₂O₂ was estimated with the use of fluorescent probe DCFDA. Both enhanced AOF generation, which was dependent on H₂O₂ concentration, and glutathione peroxidase and superoxide dismutase activation, followed by a decrease of thymocytes viability were demonstrated.

Preincubation of cells with 10⁻⁵ M fullerene C₆₀ was shown not only to prevent H₂O₂ – induced AOF generation but to increase viability of H₂O₂-treated thymocytes at more prolonged time period. The data obtained indicate to fullerene C₆₀ ability to prevent oxidative stress in thymocytes.

Key words: thymocytes, DCF, hydrogen peroxide, AOF, fullerene C₆₀, cell viability, anti-oxidant enzymes.

1. Stone J. R. // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – **422**. – P. 119–124
2. Toledano M. B., Delaunay A., Monceau L. et al. // Trends Biochem. Sci. – 2004. – **29**. – P. 351–357.
3. Csordás G., Hajnóczky G. // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – **1787**, N 11. – P. 1352–1362.
4. Antunes F., Cadenas E., Brunk U. // Biochem. J. – 2001. – **356**. – P. 549–555
5. Гребиньк Д. М., Коваль Т. В., Матышевская О. П. // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 63–69.
6. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. // Chem. Res. Toxicol. – 1992. – **5**. – P. 227–231.
7. Чевару С., Чаба И., Секей Й. // Лаб. дело. – 1985. – № 12. – С. 678–681.
8. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Персегина И. А. // Там же. – 1990. – № 8. – С. 19–22.
9. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D. // Cancer. Res. – 1987. – **15**, N 47(4). – P. 936–942.
10. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. // Carbon. – 2004. – **42**. – P. 1203–1206.
11. Tarpey M., Wink D., Grisham M. // Amer. Journ. Phys. – 2004. – **286**, N 3. – P. 431–444.
12. Коваль Т. В., Назарова О. О., Матышевская О. П. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 2. – С. 114–119.
13. Hildeman D. A., Mitchell T., Kappler J., Marrack P. // J. Clin. Invest. – 2003. – **111**. – P. 575–581.
14. Wilson S. R. Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology. – New York – 2000. – P. 437–465.
15. Da Ros T., Prato M. // Chem. Commun. – 1999. – **8**. – P. 663–669.
16. Foley S. C., Crowley M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – **294**. – P. 116–119.
17. Гринюк І. І., Прилуцька С. В., Гребіник С. М. та ін. // Досягн. біол. і мед. – 2011. – № 2(18). – С. 31–35.
18. Dugan L. L., Gabrielsen J. K., Yu S. P., Lin T. S. // Neurobiol. Disease. – 1996. – **3**. – P. 129–135.
19. Sun T., Xu Z. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2006. – **16**, N 14. – P. 3731–3734.
20. Burkitt M. J., Wardman P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – **282**, N 1 – P. 329–333.

Отримано 14.12.2011