

УДК 577.161.3

## ЭФФЕКТЫ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И ЕГО АНАЛОГОВ НА ЗАПРОГРАММИРОВАННУЮ ГИБЕЛЬ ТИМОЦИТОВ КРЫС, ИНДУЦИРОВАННУЮ ИНГИБИТОРАМИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ

Г. В. ПЕТРОВА, Н. В. ДЕЛЕМЕНЧУК, Г. В. ДОНЧЕНКО

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua

Установлено, что  $\alpha$ -токоферол ( $\alpha$ -ТФ) проявляет цитопротекторное действие при индукции апоптоза тимоцитов крыс ингибиторами внутриклеточных протеинкиназ – стауроспорином и форболовым эфиром – в высокой концентрации, а также при некрозе клеток, вызванным сфингозином. Действие  $\alpha$ -ТФ на апоптоз тимоцитов, вызванный ингибитором протеинфосфатазы типа 2А – омега-3-пальмитиновой кислотой – гораздо менее выражен. Полученные данные свидетельствуют о том, что известная способность  $\alpha$ -ТФ ингибировать протеинкиназу С (ПКС) и активировать протеинфосфатазу типа 2А не является основным механизмом его цитопротекторного действия. Частичное воспроизведение эффектов  $\alpha$ -ТФ его аналогом  $\alpha$ -токоферилацетатом, не способным вступать в окислительно-восстановительные реакции, и отсутствие влияния на изучаемые процессы антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина в данном случае не подтверждают антиоксидантный механизм действия  $\alpha$ -ТФ. Ингибирование под действием  $\alpha$ -ТФ выхода в цитозоль клеток цитохрома с свидетельствует о реализации его цитопротекторного действия на уровне митохондриальных мембран. Допускается существование универсального механизма цитопротекторного действия  $\alpha$ -ТФ, который не зависит от природы апоптогенов и реализуется на общем для большинства из них этапе индукции гибели клеток. В качестве такового предполагается предотвращение дисфункции митохондрий посредством стабилизации и снижения пермеабилитации их мембран под действием  $\alpha$ -ТФ.

*Ключевые слова:*  $\alpha$ -токоферол, апоптоз, некроз, тимоциты, протеинкиназа С, митохондрии.

Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что  $\alpha$ -токоферол ( $\alpha$ -ТФ) в культивируемых клетках различного типа проявляет цитопротекторное действие относительно широкого ряда проапоптотических факторов, включающего соединения разнообразной химической природы [1], однако механизмы данного феномена остаются неизвестными. Наиболее распространенная гипотеза антиапоптотического действия витамина Е базируется на представлении о предотвращении им пероксидного окисления остатков ненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов благодаря антиоксидантным свойствам его молекулы. Однако в последнее время антиоксидантная теория действия  $\alpha$ -ТФ подвергается все большей критике [2, 3], а данные литературы свидетельствуют о том, что его эффекты могут быть обусловлены и другими, неантиоксидантными механизмами. К ним относят способность  $\alpha$ -ТФ влиять на экспрессию генов [4, 5] и изменять активность ключевых энзимов, участвующих в регуляции клеточного метаболизма, в частно-

сти, протеинкиназы С [4, 6]. Кроме того, в последнее время все чаще высказывается мысль о том, что адаптогенные эффекты  $\alpha$ -ТФ могут быть связаны с его влиянием на катаболизм токсичных ксенобиотиков за счет индукции экспрессии энзимов их детоксикации [7].

Способность ингибировать протеинкиназу С (ПКС) – один из первых установленных фактов возможности функционирования  $\alpha$ -ТФ как модулятора клеточных процессов независимо от его антиоксидантных свойств [8]. Известно, что ПКС, представляющая собой семейство серин-треониновых изоэнзимов, принимает участие в регуляции разнообразных биохимических процессов, таких как митогенез, трансформация и апоптоз. Вследствие того, что изоэнзимы ПКС принимают участие как в положительной (проапоптотической), так и отрицательной (антиапоптотической) регуляции гибели клеток, как активаторы, так и ингибиторы ПКС (в зависимости от чувствительности к ним изоэнзимов), могут выступать в качестве проапоптотических веществ [9, 10]. Отметим, что роль самой ПКС в регуляции апоптоза не-

однозначна и в настоящее время практически не выяснена, а потому изучение механизмов, которые обеспечивают влияние  $\alpha$ -ТФ на ПКС-зависимую модуляцию апоптоза, довольно сложно. С формальной точки зрения, если активация ПКС (по крайней мере, ПКСа) приводит к усилению пролиферации и супрессии апоптоза, то ее ингибирование должно вызвать противоположные эффекты. Подчеркнем, что ингибирование именно ПКСа считается тем основным механизмом, который обеспечивает способность  $\alpha$ -ТФ снижать пролиферацию клеток гладких мышц аорты [8].

Цель работы — выяснение механизмов влияния  $\alpha$ -ТФ на апоптоз тимоцитов крысы при индукции их гибели ингибиторами внутриклеточных протеинкиназ.

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самках с массой тела 100–150 г. Согласно стандартной методике [11] были получены тимоциты, подсчитано их количество и с помощью витального красителя — трипанового синего — определена жизнеспособность клеток, которая составляла не менее 97%. Тимоциты ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 20 мМ Hepes-NaOH буфер, pH 7,3; 0,1% БСА, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, из расчета  $10^6$  клеток/мл. 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), содержащего (мМ): NaCl 136,9; KCl 2,7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5; pH 7,2. Гидрофобные индукторы апоптоза и исследуемые соединения добавляли из концентрированных маточных растворов в диметилсульфоксиде или этаноле предварительно разбавленными культуральной средой так, чтобы конечная концентрация органических растворителей не превышала 0,1%. В суспензию клеток в контроле добавляли соответствующее количество растворителей. Концентрация  $\alpha$ -ТФ составляла 100 мкМ, что соответствует диапазону его физиологической концентрации в сыворотке крови человека [6] и чаще всего применяется в такого рода исследованиях. Производные  $\alpha$ -ТФ —  $\alpha$ -токоферилацетат ( $\alpha$ -ТАц) и  $\alpha$ -токоферилхинон ( $\alpha$ -ТХ) использованы в эквивалентной с ним концентрации.

Оценку жизнеспособности клеток в рутинных экспериментах проводили с исполь-

зованием 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолий бромида (МТТ-тест) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Sigma, США). За 100% принимали количество формазана, образовавшегося в аликвоте свежeweделенных интактных тимоцитов. Уровень спонтанного апоптоза после 18 час инкубации, характерный для клеток в первичной культуре [12], составлял  $25,26 \pm 2,10\%$  и учитывался во всех постановках экспериментов.

Экстрагирование фрагментированной ДНК проводили методом, описанным в работе [13]. Качественную идентификацию фрагментов ДНК — с помощью электрофореза в 1%-ых гелях агарозы в 40 мМ трис — Na-ацетат буфере, pH 8,0, содержащем 1 мМ  $\text{Na}_2$ -ЭДТА, при напряжении электрического поля 5 В/см геля.

Для проведения вестерн-блот анализа около  $8 \times 10^6$  клеток инкубировали с исследуемыми веществами как описано выше. Фракции цитозоля получали согласно процедуре, описанной в работе [14], используя дигитонин в концентрации 50 мкг/мл. Электрофоретическое разделение протеинов проводили в 12,5% ПААГ — 0,2 М трис-ацетатный буфер, pH 7,0. В каждую лунку с гелем вносили по 30 мкг общего протеина соответствующих цитозольных фракций. В качестве электродного буфера использовали 50 мМ трис — 50 мМ трицин (pH 8,2) — 0,1% SDS — 1,3 мМ сульфит натрия [15]. Электродный буфер для переноса протеинов на PVDF-мембраны (Immobilon-P, Millipore, США) содержал 25 мМ трис — 192 мМ глицин (pH 8,3) — 10% метанола. Мембраны инкубировали 1 час в блокирующем растворе, содержащем 20 мМ трис-HCl буфер (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,05% Твин-20 (TBS-T) — 5%-е обезжиренное сухое молоко. Затем следовала инкубация в течение 1 часа с антителами против цитохрома *c* (Sigma, США, разведение 1 : 2000 в TBS-T — 3%-е обезжиренное сухое молоко) и 30 мин с вторичными иммуноглобулинами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, США, разведение 1 : 5000 в том же растворе), с промежуточным и окончательным отмыванием TBS-T 3-кратно по 10 мин. Визуализацию сигнала проводили с использованием метода усиленной хемилюминесценции, денситометрию блотограмм — с помощью программы TotalLab.

Экспериментальные данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистическая достоверность результатов оценивалась в программе SigmaPlot2000 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В широком диапазоне концентраций исследован эффект специфического модулятора активности ПКС $\alpha$  – 12-форбол-миристат-13-ацетата (ФМА) – на выживание тимоцитов. Как представлено на рис. 1, А, ФМА в диапазоне концентраций 20 нМ – 2 мкМ не влияет на жизнеспособность клеток. Однако увеличенные концентрации ФМА до 20 мкМ приводит к выраженному цитотоксическому эффекту (рис. 1, А) и сопровождается более интенсивной (по отношению к спонтанной в контроле) межнуклеосомной фрагментацией ДНК (рис. 1, Б), что свидетельствует о развитии апоптоза.

Известно, что ФМА является активатором ПКС $\alpha$  в наномолярном диапазоне концентраций и при кратковременном действии. Повышение же его концентрации до микромолярной или увеличение времени воздействия приводит к эффекту, так называемой, даун-регуляции, когда наблюдается не активация, а, наоборот, ингибирование энзима [16]. Так, форболовый эфир в концентрации до 200 нМ не индуцирует гибель клеток РС-12, в то время как повышение его концентрации до 500 нМ и увеличение времени инкубации до 48 ч вызывает апоптоз более чем 80% клеток [17]. Поэтому полученные данные полностью совпадают с представлением об отрицательной регуляции ПКС $\alpha$  гибели клеток и инициации апоптоза при ее ингибировании.

Однако выявленное нами влияние  $\alpha$ -ТФ на ФМА-индуцированный апоптоз оказалось не столь однозначным с точки зрения его спо-

собности ингибировать ПКС $\alpha$ . Показано, что на фоне добавления ФМА в концентрации 20 мкМ  $\alpha$ -ТФ повышает выживание клеток (рис. 2, А) и снижает интенсивность образования низкомолекулярных фрагментов ДНК (рис. 2, Б), т.е. проявляет антиапоптотический эффект. При этом эффект  $\alpha$ -ТАц выражен в меньшей степени, а  $\alpha$ -ТХ неэффективен в предупреждении гибели клеток. Отметим, что указанные производные  $\alpha$ -ТФ не обладают антирадикальной активностью *in vitro* [18], и следовательно не способны проявлять прямое антиоксидантное действие. Однако антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ), антирадикальная активность которого *in vitro* двукратно превышает таковую для  $\alpha$ -ТФ [18], также практически не влияет на ФМА-индуцированный апоптоз. Поскольку АЦЦ (в отличие от  $\alpha$ -ТФ) эффективно предупреждает апоптоз тимоцитов крысы, индуцированный развитием оксидативного стресса [19], мы полагаем, что антиапоптотическое действие  $\alpha$ -ТФ в данном случае не опосредуется его антиоксидантными свойствами.

Полученные данные о предотвращении  $\alpha$ -ТФ апоптоза, вызванного ингибированием ПКС $\alpha$ , не согласуются с представлением о нем как ингибиторе данного энзима. Отметим, что в работах, где впервые продемонстрирована способность  $\alpha$ -ТФ ингибировать ПКС $\alpha$ , установлено снижение активности изолированной ПКС $\alpha$ , уменьшение уровня фосфорилирования ее специфических субстратов – протеина с Мм 80 кДа и гистона H1, а также предотвращение транслокации цитозольной ПКС $\alpha$  во фракцию мембран при действии  $\alpha$ -ТФ [20].

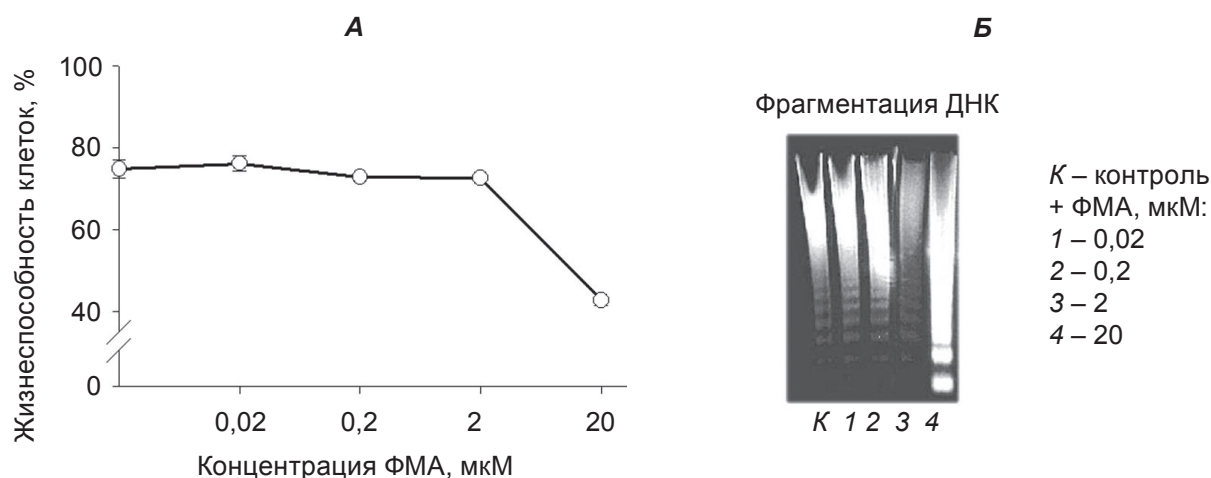


Рис. 1. Жизнеспособность тимоцитов крысы (А) и электрофореграмма образовавшихся низкомолекулярных фрагментов ДНК (Б) при инкубации клеток с ФМА в различных концентрациях. Шкала оси абсцисс имеет логарифмическое выражение

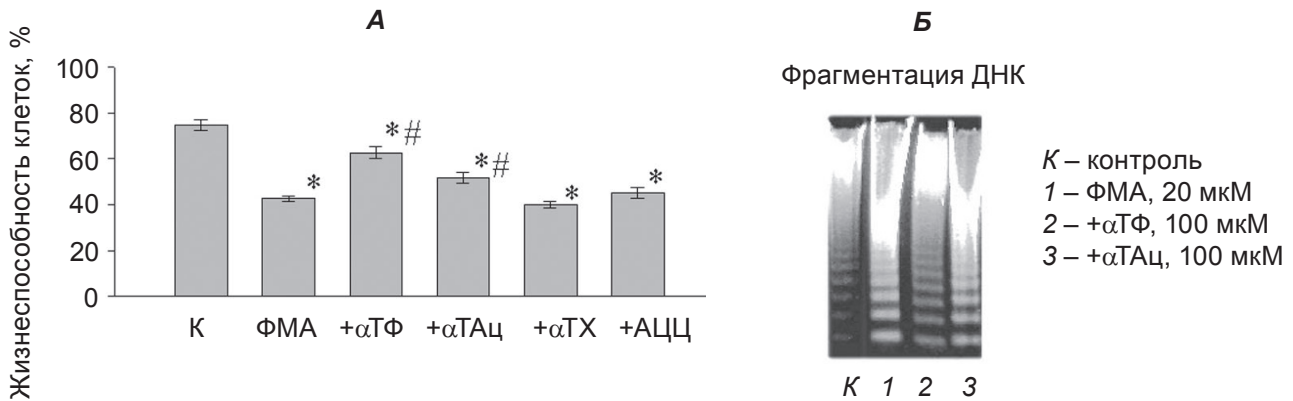


Рис. 2. Жизнеспособность тимоцитов крыс (А) и электрофореграмма образовавшихся низкомолекулярных фрагментов ДНК (Б) при инкубации клеток с 20 мкМ ФМА и добавлении 100 мкМ  $\alpha$ -ТФ,  $\alpha$ -ТАц,  $\alpha$ -ТХ и 10 мМ АЦЦ. \* $P < 0,05$  относительно контроля, # $P < 0,05$  относительно ФМА

При оценке активности ПКС $\alpha$  по уровню связывания [ $^3$ H]-форбол-12,13-дибутирата, однако было выявлено, что  $\alpha$ -ТФ не снижает, а, наоборот, существенно увеличивает уровень включения меченого эфира, что свидетельствует об активации ПКС $\alpha$ . Кроме того, в условиях даун-регуляции ПКС $\alpha$  ФМА,  $\alpha$ -ТФ также активирует фермент и увеличивает его синтез *de novo* после реактивации [8, 20]. Помимо этого ингибирующее действие  $\alpha$ -ТФ на ПКС $\alpha$  зависит от типа клеток. Наибольший эффект  $\alpha$ -ТФ наблюдается в культуре клеток гладких мышц аорты А7г5, но в культуре клеток фибробластов 3Т3 его действие гораздо менее выражено. ПКС $\alpha$  клеток остеосаркомы Saos-2 абсолютно не чувствительна к  $\alpha$ -ТФ, в то время как для ее ингибирования в клетках нейробластомы NB2A необходима концентрация  $\alpha$ -ТФ, значительно превышающая физиологическую [8].

Хотя в литературе имеются данные о способности  $\alpha$ -ТФ ингибировать именно ПКС $\alpha$ , практически такие же результаты были получены при исследовании влияния  $\alpha$ -ТФ и его аналогов на апоптоз тимоцитов, индуцированный индокарбазолом стауроспорином, обладающим ингибиторным действием по отношению к серин-треониновым и тирозиновым протеинкиназам, в том числе и к изоэнзимам ПКС [21].

Как показано, стауроспорин в концентрации 50 нМ индуцирует гибель клеток (рис. 3, А) по апоптотическому пути, о чем свидетельствует межнуклеосомная фрагментация ДНК (рис. 3, Б). Практически полностью  $\alpha$ -ТФ восстанавливает жизнеспособность тимоцитов, а также снижает интенсивность образования низкомолекулярных фрагментов ДНК.  $\alpha$ -ТАц

также предупреждает стауроспорининдуцированную гибель клеток, хотя его эффект менее выражен, чем у  $\alpha$ -ТФ.  $\alpha$ -ТХ не влияет на апоптоз тимоцитов.

Существуют данные о том, что индукция стауроспорином апоптоза нейрональных клеток сопровождается повышением уровня АФК, развитием оксидативного стресса, истощением пула глутатиона. Указанные процессы эффективно ингибируются  $\alpha$ -ТФ [22]. Авторы цитируемой работы делают вывод о способности  $\alpha$ -ТФ предотвращать падение уровня глутатиона в клетках за счет антиоксидантного действия. Однако в наших экспериментах предшественник синтеза глутатиона АЦЦ проявляет значительно менее выраженный антиапоптотический эффект, чем  $\alpha$ -ТФ (рис. 3, А). Это дает нам основание предположить неантиоксидантный механизм антиапоптотического действия  $\alpha$ -ТФ и в данном случае. Основываясь на полученных результатах о неспособности АЦЦ и водорастворимого аналога  $\alpha$ -ТФ тролокса (в отличие от  $\alpha$ -ТФ) ингибировать стауроспорининдуцированный апоптоз клеток HeLa, сходные выводы были сделаны также авторами работы [23].

Существуют данные о первичной (по отношению к ингибированию ПКС) способности стауроспорина вызывать двухцепочечные разрывы ДНК и преапоптотическую конденсацию хроматина с дальнейшим развитием апоптоза по зависимому от митохондрий пути [24]. Следовательно, ингибирование внутриклеточных протеинкиназ не является единственной причиной индукции апоптоза стауроспорином, а эффект  $\alpha$ -ТФ может быть опосредствован влиянием на общий для большинства апопто-

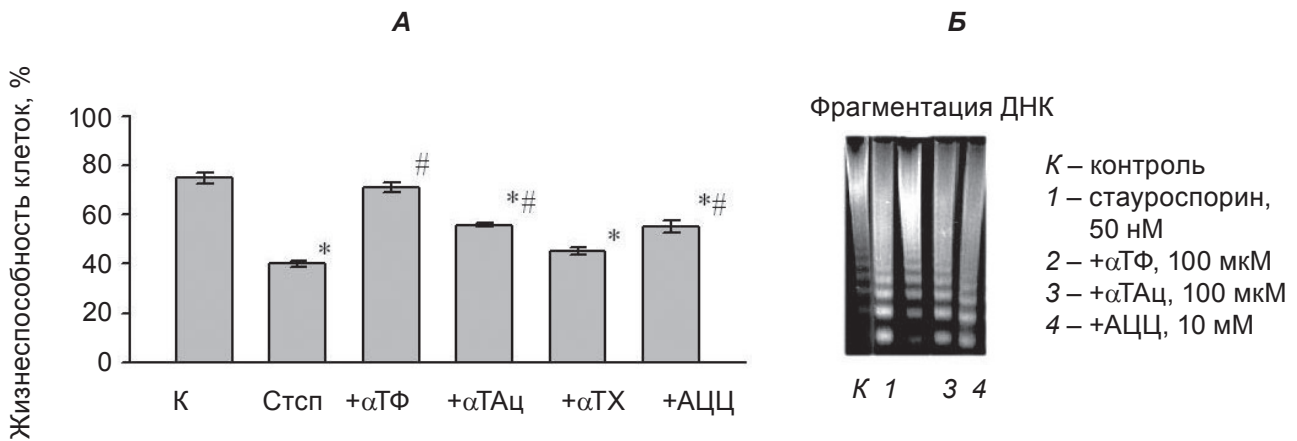


Рис. 3. Жизнеспособность тимоцитов крыс (А) и электрофореграмма образовавшихся низкомолекулярных фрагментов ДНК (Б) при инкубации клеток со стауроспорином (Стсп) в концентрации 50 нМ и добавлении 100 мкМ α-ТФ, α-ТАц, α-ТХ и 10 мМ АЦЦ. \*  $P < 0,05$  относительно контроля, #  $P < 0,05$  относительно стауроспорина

генов этап развития апоптоза. Забегая вперед, отметим, что таким может быть предупреждение α-ТФ дисфункции митохондрий – основной органеллы, обеспечивающей инициацию апоптоза.

Нами был использован еще один ингибитор ПКС – сфингозин, являющийся известным природным липидным медиатором апоптоза. Кроме ПКС, сфингозин ингибирует также ряд других клеточных протеинкиназ, таких как v-Src или c-Src тирозин-протеинкиназа,  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимая протеинкиназа, MAPK и т.п. [25]. Сфингозин способен также повышать проницаемость мембран внутриклеточных органелл, например лизосом, что приводит к высвобождению в цитозоль катепсинов и активации лизосомного пути апоптоза [26], а также индуцирует повышение проницаемости митохондриальных мембран, что активирует внутренний путь апоптоза [27].

Сфингозин, зависимым от концентрации образом, вызывает гибель тимоцитов (рис. 4, А), но при этом не наблюдается образование апоптических фрагментов ДНК (рис. 4, Б), что свидетельствует об индукции некротического пути их гибели. Хотя и в этом случае α-ТФ и α-ТАц (в значительно меньшей степени) предотвращают гибель тимоцитов, а α-ТХ не влияет на жизнеспособность клеток (рис. 4, Б).

Необходимо отметить, что среди использованных в данной работе ингибиторов ПКС, только сфингозин является физиологическим соединением. Несмотря на способность сфингозина ингибировать ПКС и, таким образом, влиять на многочисленные биохимические процессы, зависящие от активности данно-

го энзима, существует немало других проявлений биологической активности сфингозина, которые тем или другим способом могут быть привлечены в контроль гибели клетки. Однако, принимая во внимание способность сфингозина вызвать гибель клеток за счет детергентподобной дестабилизации мембран [26, 27], можно предположить, что именно предотвращение нарушения интеграции внутриклеточных мембран (в том числе и митохондриальных) может быть тем механизмом, который обеспечивает цитопротекторное действие α-ТФ в данном случае.

Известно, что ингибирование α-ТФ-м ПКС сопровождается снижением уровня ее аутофосфорилирования, от которого, в свою очередь, зависит активность энзима. Предполагается, что опосредствованный механизм влияния α-ТФ на активность ПКС заключается в активации им протеинфосфатазы типа 2А [28], субстратом которой является данный энзим.

Как показано на рис. 5, инкубация клеток со специфическим ингибитором протеинфосфатазы типа 2А – оокадаевой кислотой – приводит к их гибели (рис. 5, А). Однако, хотя в этом случае только α-ТФ увеличивает выживание клеток (рис. 5, Б), его цитопротекторное действие менее выражено, чем в случае индукции гибели клеток веществами, ингибирующими ПКС. Поэтому, по нашему мнению, активация протеинфосфатазы типа 2А не является основным механизмом, который обеспечивает антиапоптотический эффект α-ТФ на фоне действия ингибиторов ПКС.

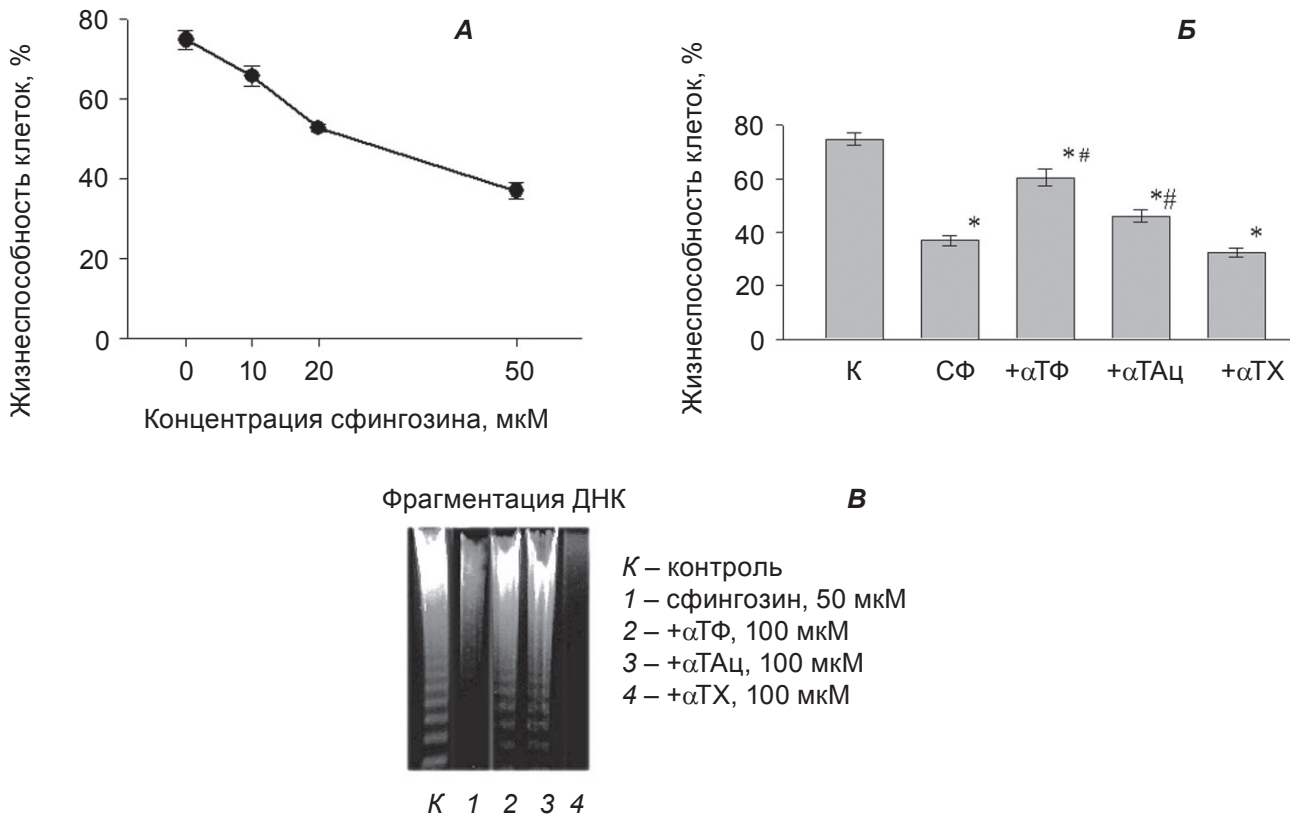


Рис. 4. Жизнеспособность тимоцитов крыс при инкубации со сфингозином в различных концентрациях (А), при добавлении на фоне 50 мкМ сфингозина (СФ) 100 мкМ α-ТФ, α-ТАц и α-ТХ (Б), а также электрофореграмма образовавшихся низкомолекулярных фрагментов ДНК (В). \* $P < 0,05$  относительно контроля, #  $P < 0,05$  относительно сфингозина

Таким образом, α-ТФ проявляет цитопротекторный эффект при индукции гибели клеток разнообразными ингибиторами клеточных протеинкиназ, что не согласуется с данными литературы о его способности ингибировать ПКС. Безусловно, учитывая разнообразие клеточных протеинкиназ и их неоднозначное, иногда прямо противоположное, влияние на апоптоз, существует возможность того, что α-ТФ может быть как ингибитором одних, так и активатором других энзимов. Однако, учитывая многообразие предполагаемых механизмов физиологического действия витамина Е, мы полагаем, что механизмы, по крайней мере, его антиапоптотического эффекта не связаны с модулированием активности ПКС.

Принимая во внимание имеющиеся на сегодня экспериментальные данные относительно способности α-ТФ предупреждать гибель клеток, индуцированную широким рядом цитотоксических соединений, вызывающих гибель клеток с привлечением различных механизмов (по крайней мере, тех, которые определяют их первичный эффект),

мы предполагаем существование «универсального» механизма антиапоптотического действия α-ТФ, не зависящего от природы апоптогенного фактора, т.е. реализующегося на общем для большинства апоптогенов этапе развития гибели клетки. Ранее нами было показано [18], что наибольший в количественном отношении цитопротекторный эффект α-ТФ наблюдается при индукции гибели тимоцитов митохондриальными токсинами – антимицином А и олигомицином, чья цитотоксичность определяется прямым нарушением функционирования митохондрий. Поскольку митохондрия является основной органеллой, определяющей как внутренний путь развития апоптоза, так и, в определенной мере, некротическую гибель клетки [29], мы полагаем, что предупреждение дисфункции митохондрий и является тем универсальным механизмом, который опосредует цитопротекторное действие α-ТФ по отношению к различным апоптогенам.

К основным и наиболее ранним биохимическим событиям, происходящим в митохондриях под воздействием проапоптотического

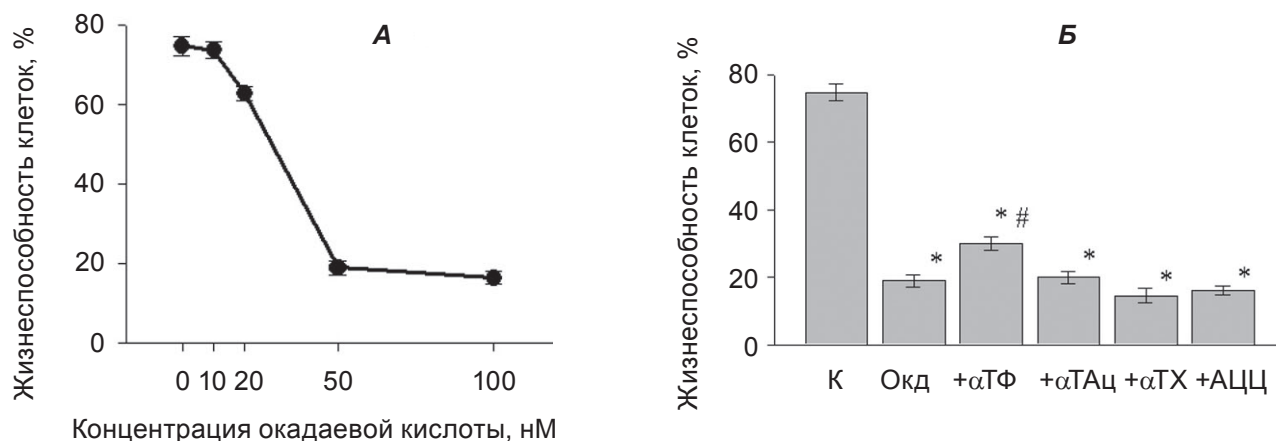


Рис. 5. Жизнеспособность тимоцитов крыс при инкубации с окадаевой кислотой (Окд) в различных концентрациях (А) и при добавлении на фоне 50 нМ окадаевой кислоты 100 мкМ α-ТФ, α-ТАц, α-ТХ и 10 мМ АЦЦ (Б). \*P < 0,05 относительно контроля, #P < 0,05 относительно окадаевой кислоты

сигнала, относятся фактически два. Повышение проницаемости (пермеабилзация) внешней и/или внутренней митохондриальных мембран для молекул и ионов, неспособных проникать через соответствующие мембраны нормальных митохондрий, и, как результат, выход в цитозоль клетки локализованных в межмембранном пространстве митохондрий проапоптических протеинов, одним из которых является цитохром с. Последующая индукция каскадной активации каспаз считается той точкой отсчета, после которой гибель клетки неотвратима.

Как представлено на рис. 6 (панель А), в цитозольной фракции свежевыделенных тимоцитов цитохром с не обнаруживается, хотя идентифицируется в цитозоле контрольных тимоцитов после 18 час инкубации, что обусловлено спонтанным апоптозом, характерным для лимфоидных клеток в первичных культурах. Индукция апоптоза как ФМА (панель Б), так и стауроспорином (панель В) приводит к повышению количества цитохрома с в цитозоле тимоцитов. Степень ингибирования этого процесса α-ТФ и его аналогами согласуется с их влиянием на жизнеспособность тимоцитов и на интенсивность образования апоптических фрагментов ДНК. Учитывая тот факт, что в этом ряду выход проапоптических протеинов из митохондрий является первичным событием, мы полагаем, что предупреждение именно дисфункции митохондрий определяет цитопротекторные свойства α-ТФ в данном случае.

Индукция некроза тимоцитов сфингозином не сопровождается явным увеличением количества цитохрома с в цитозольной фрак-

ции (панель Г). Этот факт согласуется с существующими на сегодня представлениями о биохимических признаках гибели клеток по некротическому пути [30]. Однако отметим, что характерное для некроза набухание митохондрий и дальнейший разрыв их внешней мембраны за счет повышения осмотического давления внутри митохондрий, вызванного открытием митохондриальной поры [30,31], неизбежно должны приводить к появлению цитохрома с в цитозольной фракции. Скорее всего, наблюдаемое при некрозе (в отличие от апоптической гибели) нарушение целостности плазматической мембраны и, как результат, выход внутриклеточного содержимого в культуральную среду не позволяют идентифицировать цитохром с в цитозоле клеток после их осаждения и отмывания, как этого требует методический протокол. Поэтому, хотя выраженное цитопротекторное действие α-ТФ на фоне индукции некротической гибели тимоцитов сфингозином и не сопровождается видимым изменением количества цитохрома с в цитозоле, однако, скорее всего, также определяется стабилизацией α-ТФ митохондриальных мембран.

Мы полагаем, что цитопротекторное действие α-ТФ не определяется его антиоксидантными эффектами и не зависит от способности ингибировать ПКС, а обусловлено интеграцией в мембраны митохондрий, стабилизацией их структурно-функциональных параметров и, таким образом, предотвращением их пермеабилзации.

В заключение отметим, что способность α-ТФ проявлять антиапоптотические и антине-

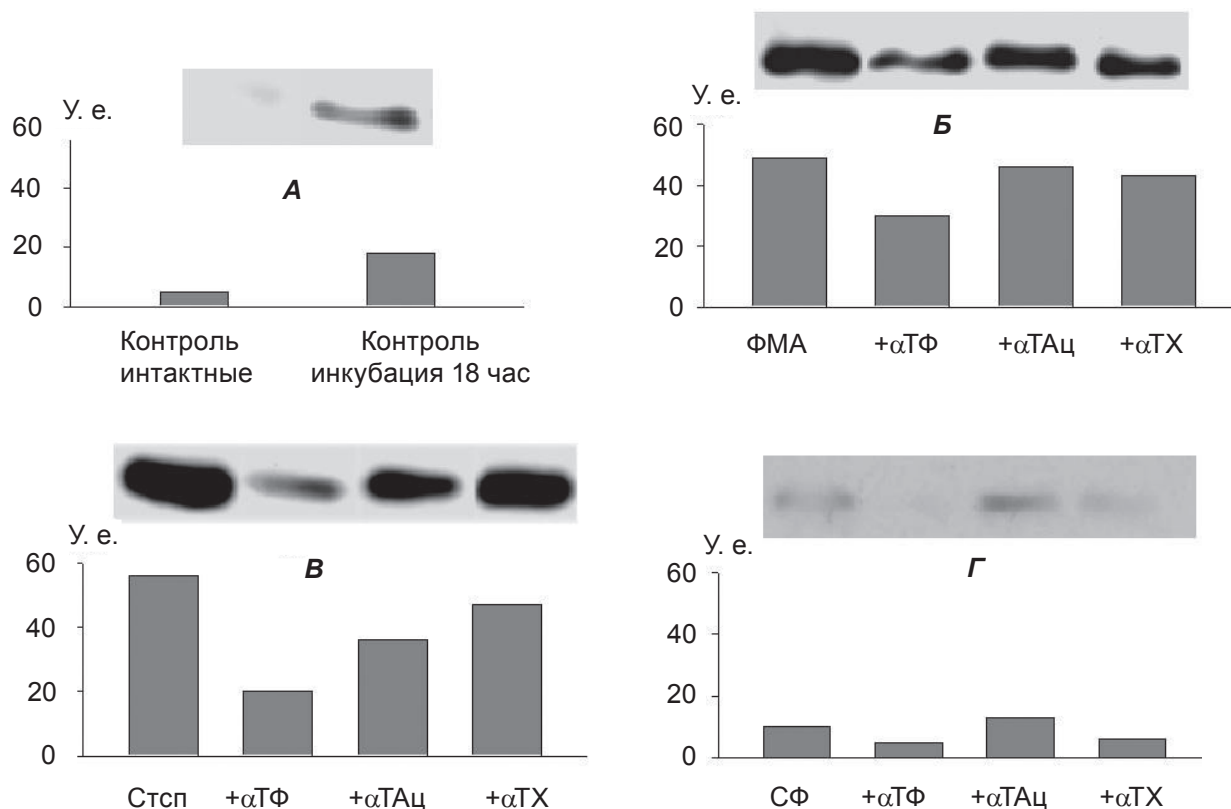


Рис. 6. Количество цитохрома с в цитозольной фракции тимоцитов крыс в контроле (А), при инкубации с 20 мкМ ФМА (Б), 50 нМ стауроспорином (В), 50 мкМ сфингозином (Г) и при дополнительном внесении 100 мкМ α-ТФ, α-ТАц и α-ТХ

критические эффекты по отношению к широкому ряду индукторов гибели клеток, на первый взгляд, можно рассматривать как положительные для клетки и организма в целом. Однако цитопротекторные эффекты α-ТФ относительно индуцированной (в данном случае химиотерапевтическими соединениями) гибели могут проявляться по отношению не только к нормальным, но и к раковым клеткам [23, 32]. По нашему мнению, сегодня существует достаточное количество экспериментальных данных, которые обосновывают необходимость перевода витамина Е из разряда «безопасных» и безоговорочно полезных для человека витаминов в разряд соединений, имеющих высокую биологическую активность и в зависимости от многочисленных факторов, оказывающих как положительное, так и отрицательное влияние на организм человека.

### ЭФЕКТЫ α-ТОКОФЕРОЛУ І ЙОГО АНАЛОГІВ НА ЗАПРОГРАМОВАНУ ЗАГИБЕЛЬ ТИМОЦИТІВ ЩУРІВ, ІНДУКОВАНУ ІНГІБІТОРАМИ КЛІТИННИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ

Г. В. Петрова, Н. В. Делеменчук,  
Г. В. Донченко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua

Встановлено, що α-токоферол (α-ТФ) виявляє цитопротекторну дію за індукції апоптозу тимоцитів щурів інгібіторами внутрішньоклітинних протеїнкіназ — стауроспорином і форболовим ефіром у високій концентрації, а також некрозу клітин, спричиненого сфингозином. Ефект α-ТФ на за-



гибель тимоцитів, яка зумовлена інгібітором протеїнфосфатази типу 2A — окадаєвою кислотою — набагато менш виражений. Одержані дані свідчать про те, що відома здатність  $\alpha$ -ТФ до інгібування ПКС і активації протеїнфосфатази типу 2A не є основним механізмом його цитопротекторної дії. Часткове відтворення ефектів  $\alpha$ -ТФ його аналогом  $\alpha$ -токоферилацетатом, нездатним вступати в окисно-відновлювані реакції, і відсутність впливу на досліджувані процеси антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну у цьому разі не підтверджують антиоксидантний механізм дії  $\alpha$ -ТФ. Інгібування  $\alpha$ -ТФ-м виходу до цитозолу клітин цитохрому *c* свідчить про реалізацію його цитопротекторної дії на рівні мітохондріальних мембран. Припускається існування універсального механізму цитопротекторної дії  $\alpha$ -ТФ, який не залежить від природи апоптогенів та реалізується на загальному для більшості з них етапі індукції загибелі клітин. Як такий запропоновано попередження дисфункції мітохондрій шляхом стабілізації мембран мітохондрій і зниження їх пермеабілізації за дії  $\alpha$ -ТФ.

Ключові слова:  $\alpha$ -токоферол, апоптоз, некроз, тимоцити, протеїнкіназа C, мітохондрії.

**EFFECTS OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL AND ITS ANOLOGUES ON RAT THYMOCYTES PROGRAMMED DEATH INDUCED BY PROTEIN KINASE INHIBITORS**

G. V. Petrova, N. V. Delemenchuk,  
G. V. Donchenko

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua

**S u m m a r y**

It is established that  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TPh) shows cytoprotective effect at the induction of rats' thymocytes apoptosis by endocellular protein kinase inhibitors — staurosporine and phorbol ether in high concentration, and also on necrosis of the cells caused by sphingosine. The effect of  $\alpha$ -TPh on thymocytes death caused by protein phosphatase type 2A inhibitor okadaic acid is much less expressed. The obtained data testify that the known ability of  $\alpha$ -TPh to the inhibition of PKC and to the activation of protein phosphatase type 2A is not the main mechanism of its cytoprotective action. Partial reproduction of  $\alpha$ -TPh effects by its analogue  $\alpha$ -tocopherol acetate which is not

capable to enter in redox reactions, and the absence of influence on the studied processes of an antioxidant of N-acetyl-L-cysteine do not confirm the antioxidant mechanism of  $\alpha$ -TPh action in this case. The inhibition by  $\alpha$ -TPh of the release of cytochrome *c* in the cytosol of cells testifies to the implementation of its cytoprotective effect at the level of mitochondrial membranes. We assume the existence of the universal mechanism of  $\alpha$ -TPh cytoprotective action that does not depend on the nature of apoptogenes and realized on the general for the majority of them stage of the cells death induction. The prevention by  $\alpha$ -TPh of mitochondria dysfunction by stabilizing mitochondrial membranes and reduction of their permeabilization is supposed as that.

Key words:  $\alpha$ -tocopherol, apoptosis, necrosis, thymocytes, protein kinase C, mitochondria.

1. D'Agostini F., Izzotti R., Balansky A. M. // *Mutat. Res.* — 2005. — **591**. — P. 173–186.
2. Brigelius-Flohé R. // *Free Rad. Biol. Med.* — 2009. — **46**. — P. 543–554.
3. Azzi A. // *Ibid.* — 2007. — **43**. — P. 16–21
4. Azzi A., Gysin R., Kempná P. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — **1031**. — P. 86–95.
5. Glauert H. P. // *Vitam. Horm.* — 2007. — **76**. — P. 135–153.
6. Zingg J. M. // *Mol. Asp. Med.* — 2007. — **28**. — P. 481–506.
7. Mustacich D. J., Gohil K., Bruno R. S. et al. // *J. Nutr. Biochem.* — 2009. — **20**, N 6. — P. 469–476.
8. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 10. — P. 6188–6194.
9. Caino M. C., Meshki J., Kazanietz M. G. // *Apoptosis.* — 2009. — **14**. — P. 392–408.
10. Nakajima T. // *J. Radiat. Res.* — 2008. — **49**. — P. 1–8.
11. *Лимфоциты. Методы / Пер. с англ. А. Н. Мац, А. А. Фельдшера.* — М.: Мир, 1990. — 393 с.
12. Mann C. L., Hughes F. M., Cidlowski J. A. // *Endocrinol.* — 2000. — **141**, N 2. — P. 528–538.
13. Herrmann M., Loren H. M., Voll R. et al. // *Nucl. Acids Res.* — 1994. — **22**, N 24. — P. 5506–5507.
14. Arnoult D. // *Methods.* — 2008. — **44**. — P. 229–234.
15. Cubillos-Rojas M., Amair-Pinedo F., Tato I. et al. // *Electrophoresis.* — 2010. — **31**. — P. 1318–1321.
16. Liu W. S., Heckman C. A. // *Cell Signal.* — 1998. — **10**. — P. 529–542.

17. *Hahna M. A., Mayne G. C.* // Cell Biol. Int. – 2004. – **28**. – P. 345–359.
18. *Петрова Г. В.* // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 2. – С. 85–92.
19. *Петрова Г. В., Донченко Г. В.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С. 94–102.
20. *Clement S., Tasinato A., Boscoboinic D. et al.* // Eur. J. Biochem. – 1997. – **246**. – P. 745–749.
21. *Nakano H., Omura S.* // J. Antibiot. – 2009. – **62**. – P. 17–26.
22. *Ahlemeyer B., Krieglstein J.* // Neurochem. Int. – 2000. – **36**, N 1. – P. 1–5.
23. *Pedeboscq S., Rey C., Petit M. et al.* // PLoS One. – 2012. – **7**, N 5. – e3681. – Онлайн публикация [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
24. *Andreau K., Castedo M., Perfettini J. L. et al.* // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 53. – P. 55937–55945.
25. *Mao C., Obeid L. M.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – **1781**, N 9. – P. 424–434.
26. *Kagedal K., Zhao M., Svensson I. et al.* // Biochem. J. – 2001. – **359**. – P. 335–343.
27. *Cuvillier O., Nava V. E., Murthy S. K. et al.* // Cell Death Differ. – 2001. – **8**. – P. 162–171.
28. *Azzi A., Stocker A.* // Prog. Lipid Res. – 2000. – **39**, N 3. – P. 231–255.
29. *Владимиров Ю. А.* // Биол. мембраны. – 2002. – **19**, № 5. – С. 356–377.
30. *Lemasters J. J., Qian T., Bradham C. A. et al.* // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – N 4. – P. 305–319.
31. *Kim J. S., He L., Lemasters J. J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – **304**, N 3. – P. 463–470.
32. *Peralta E. A., Viegas M. L., Louis S. et al.* // Surgery. – 2006. – **140**, N 4. – P. 607–614.

Получено 11.06. 2012