ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

11 • 2009

БІОХІМІЯ

УДК 577.121:577.218

© 2009

Г. В. Петрова, М. М. Великий,
академік НАН України **С. В. Комісаренко**

Цитотоксична дія азидотимідину (зидовудину) на тимоцити щура. Захисний ефект α-токоферолу

Азидотимідин (зидовудин), перший нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази, який широко використовується в лікуванні хворих на СНІД та ВІЛ-інфікованих, дозозалежно індукує загибель культури тимоцитів за апоптичним шляхом. α-Токоферол зменшує цитотоксичність азидотимідину й підвищує життєздатність тимоцитів. Механізм захисної дії α-токоферолу може грунтуватись на запобіганні дисфункції мітохондрій — основних субклітинних структур, що забезпечують ініціацію й подальший розвиток апоптозу.

У лікуванні синдрому набутого імунодефіциту (СНІД) та запобіганні розвитку ВІЛ-інфекції використовують переважно три основні групи препаратів: нуклеозидні/нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази (НІЗТ), ненуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (ННІЗТ) та інгібітори протеази ВІЛ, дія яких спрямована на максимальне пригнічення реплікації ВІЛ та на відновлення функцій імунної системи [1]. Основним препаратом класу НІЗТ і одним з найпоширеніших фармацевтичних засобів, що застосовуються в антиретровірусній терапії ВІЛ-інфікованих пацієнтів, є азидотимідин (АЗТ, зидовудин, 3′-азидо-3′-дезокситимідин). Однак тривалий прийом великих кількостей антиретровірусних препаратів, необхідний для створення та підтримання їх високої діючої концентрації, обумовлює токсичні прояви та значні побічні ефекти, що охоплюють широкий спектр патологічних змін в організмі. Серед патологій найбільш характерними є супресія клітин кісткового мозку, міопатія, кардіоміопатія, прогресуюча полінейропатія, панкреатит, порушення функції нирок, плаценти тощо [2–4]. Тому пошук ефективних біологічно активних сполук, зокрема природного походження, здатних зменшувати прояви побічних ефектів азидотимідину у супровідній терапії, є актуальною біомедичною проблемою.

Нами на моделі тимоцитів щура досліджено цитотоксичну дію азидотимідину та корегуючий вплив α-токоферолу — природного низькомолекулярного біологічно активного адаптогену.

Матеріали і методи досліджень. Тимоцити щурів лінії Вістар віком 2–3 міс. та масою тіла 150–200 г отримували згідно зі стандартним методом, підраховували кількість

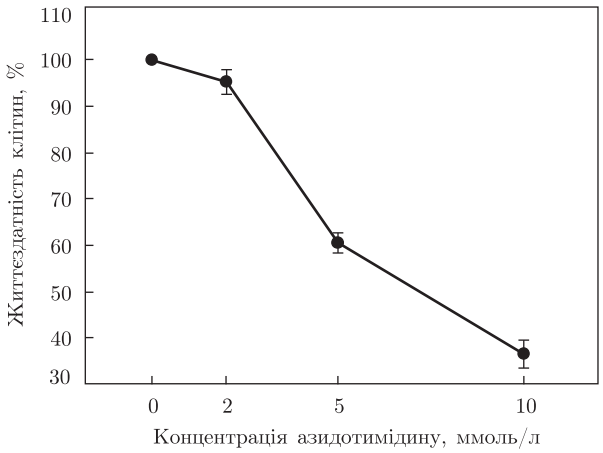

Рис. 1. Життєздатність тимоцитів щура при інкубації з азидотимідином у різних концентраціях

клітин з використанням 0,2% розчину барвника трипанового синього і визначали їх життєздатність, яка становила не менше 97%.

$2 \cdot 10^6$ клітин ресуспендували в 1 мл середовища RPMI-1640, що містило 20 ммоль/л Hepes-NaOH буфер, pH 7,3; 0,1% БСА, 100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і 50 мкмоль/л β-меркаптоетанолу. Клітини інкубували протягом 18 год при 37 °C з досліджуваними сполуками, після чого осаджували центрифугуванням (200 g, 5 хв) і відмивали в 1 мл забуференого до pH 7,2 фізіологічного розчину, що містив, ммоль/л: NaCl 136,9; KCl 2,7; Na_2HPO_4 8,1; KH_2PO_4 1,5.

Оцінку життєздатності клітин проводили з використанням 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразолій броміду (МТТ-тест). За 100% приймали кількість формазану, що утворювалась у аліквоті щойновиділених інтактних тимоцитів.

Електрофоретичний розподіл фрагментів ДНК здійснювали в 40 ммоль/л трис-ацетатному буфері, pH 8,0, що містив 1 ммоль/л Na_2-ЕДТА, при напрузі електричного поля 5 В на 1 см довжини гелю.

Активність каспази-3 оцінювали за рівнем гідролізу специфічного пептидного субстрату Ac-DEVD-pNA відповідно до технічного протоколу фірми-виробника ("Sigma", США). Активність каспази-3 виражали в нмоль р-нітроаніліну, що вивільнився за 1 хв у 1 мл клітинного лізату, використовуючи мкмолярний коефіцієнт екстинції для р-нітроаніліну, що дорівнює 10,5.

Статистичну достовірність результатів оцінювали в програмі SigmaPlot2000 з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Тимоцити щура являють собою імунонекомпетентні малі лімфоцити в стані спокою, що розташовані в кірковому шарі тимуса і кількість яких більше 90% всіх його клітин. Ці клітини є високочутливими до ушкоджуючої дії різних хімічних і фізичних чинників. Дослідження залежності виживання тимоцитів від концентрації азидотимідину показали його чітко виражену дозозалежну цитотоксичну дію в інтервалі мілімолярних концентрацій (рис. 1). За концентрації азидотимідину 5 ммоль/л загибель тимоцитів становила 39,5%, а зі збільшенням концентрації до 10 ммоль/л — зростала до 63,5%. Ми не спостерігали зниження ступеня виживання тимоцитів під дією мікромолярних концентрацій азидотимідину (результати не наведені). Однак відомо, що вже при концентрації 5 мкмоль/л азидотимідин призводить до дисфункції мітохондрій кліт-

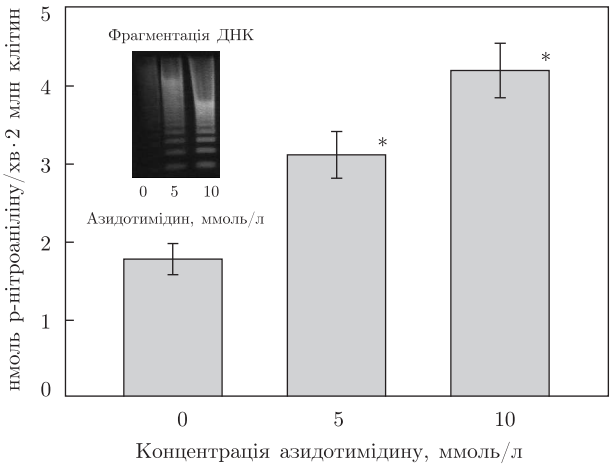

Рис. 2. Активність каспази-3 та електрофореграма низькомолекулярних фрагментів ДНК, що утворились (врізка), при інкубації тимоцитів щура з азидотимідином у різних концентраціях.
$^{*}P < 0{,}05$ відносно контролю

тин ендотелію та одночасного збільшення продукції активних форм кисню за відсутності загибелі клітин у досліджуваних умовах [5]. Тобто здатність азидотимідину викликати загибель клітин виявляється за його відносно високої концентрації, яка може створюватись в організмі людини за тривалого прийому великих кількостей азидотимідину як антиретровірусного препарату.

Для з'ясування шляху, за яким відбувається загибель тимоцитів під впливом азидотимідину, були досліджені параметри, що вважаються біохімічними маркерами апоптозу. У наших експериментах загибель тимоцитів за дії азидотимідину супроводжувалась появою низькомолекулярних фрагментів ДНК, які при електрофорезі в гелі агарози формували так звану апоптичну драбину. Одночасно спостерігалось підвищення активності каспази-3 — специфічної цистеїнової протеїнази, з активацією якої пов'язана деградація відповідних протеїнів на пізніх етапах апоптичного процесу (рис. 2). Одержані дані свідчать про те, що загибель тимоцитів під дією азидотимідину відбувається за апоптичним механізмом.

За результатами морфологічних досліджень встановлено, що при тривалій терапії з використанням азидотимідину зазвичай виникають токсичні міопатії з характерними змінами мітохондрій, а також виявляються глікогенові включення та краплі ліпідів у саркоплазмі. Відбувається атрофія фібрилярних волокон та з'являються ендомезіальні інфільтрати, що вміщують макрофаги і $CD8^{+}$ клітини [6]. Крім того, в біоптатах м'язів хворих, що отримували азидотимідин, зменшується активність сукцинат-цитохром С-редуктази, цитохромоксидази і цитратсинтази. Зменшення активності цитохромоксидази є настільки постійним явищем при тривалому прийомі азидотимідину, що може служити біомаркером мітохондріальної токсичності, індукованої цим антиретровірусним препаратом [3, 7].

Індукція загибелі клітин азидотимідином виявляється насамперед у пошкодженні мітохондрій, оскільки він вибірково накопичується в мітохондріях, що діляться. А молекулярний механізм дії азидотимідину грунтується, очевидно, на гальмуванні фосфорилювання тимідину з утворенням TMP, а отже, і реплікації мтДНК [8]. Крім того, похідне азидотимідину — відповідний нуклеозидтрифосфат, інгібує ДНК-полімеразу γ, що обумовлює деградацію мтДНК [3, 9]. Азидотимідиніндукована цитотоксичність може також обумовлюватись розвитком оксидативного стресу, прямим інгібуванням біоенергетичних процесів

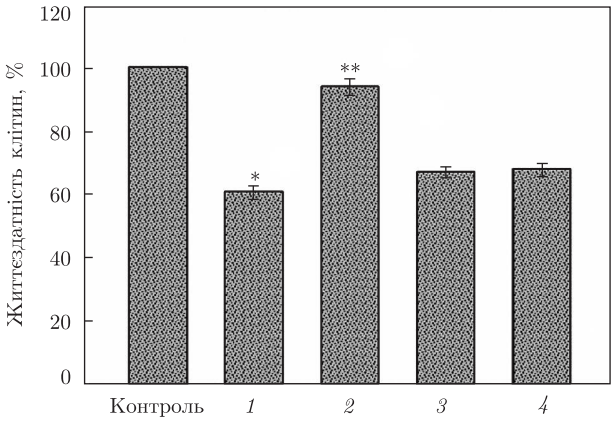

Рис. 3. Життєздатність тимоцитів щура при дії азидотимідину в концентрації 5 ммоль/л (*1*) та при додатковому впливі α-токоферолу, 100 мкмоль/л (*2*), кверцетину, 50 мкмоль/л (*3*) і нікотинаміду, 1 ммоль/л (*4*).
$^{*}P < 0{,}05$ відносно контролю, $^{**}P < 0{,}05$ відносно додавання азидотимідину

у мітохондріях, виснаженням мітохондріального пулу L-карнітину тощо [3, 4]. Тому при антиретровірусній терапії важливим чинником зменшення токсичності препаратів є достатня забезпеченість організму природними антиоксидантами, зокрема вітамінами Е, А та С [2].

З огляду на викладене ми дослідили вплив загальновідомого жиророзчинного антиоксиданта α-токоферолу, флавоноїду кверцитину, а також нікотинаміду — попередника біосинтезу $НАД^{+}$, на азидотимідиніндуковану загибель тимоцитів.

Як свідчать результати досліджень (рис. 3), за концентрації азидотимідину в середовищі 5 ммоль/л α-токоферол у концентрації 100 мкмоль/л відновлював життєздатність тимоцитів практично до рівня контролю. Оскільки біологічну дію α-токоферолу в основному пов'язують з його здатністю запобігати пероксидному окисненню ліпідів за розвитку оксидативного стресу, отримані дані можуть підтверджувати роль оксидативного стресу в розвитку азидотимідиніндукованого апоптозу [2]. Разом з тим пряма участь вітаміну Е у функціонуванні мітохондрій може обумовлювати універсальну (тобто незалежну від природи апоптогенного чинника) роль α-токоферолу в запобіганні апоптозу. α-Токоферол стабілізує мітохондріальну мембрану, посилює спряженість дихання й окиснювального фосфорилювання, збільшує продукцію АТФ та активує ряд ензимів ланцюга транспорту електронів [10]. Зокрема, у моделі цитотоксичності, індукованої Ca^{2+}-іонофором A23187, що викликає дисфункцію мітохондрій, α-токоферол пригнічував генерацію супероксиду, знижував швидкість метаболізму арахідонової кислоти та вміст простагландинів за рахунок інгібування фосфоліпази A_2 і циклооксигенази, а також запобігав втраті мітохондріями глутатіону, тобто фактично впливав на ключові біохімічні реакції, залучені в апоптоз [10]. Крім того, як показано одним із співавторів раніше, найбільший ефект щодо запобігання апоптозу, індукованого різними чинниками, α-токоферол виявляв саме при дії мітохондріальних токсинів, що безпосередньо пошкоджують цю структуру [11].

Відомо також, що α-токоферол пригнічує експресію мРНК ліганду CD95L та захищає Т клітини ВІЛ-1-інфікованих пацієнтів від CD95-опосередкованого апоптозу [12], а також зменшує експресію рецептора CD11b поліморфоядерних нейтрофілів у інфікованих мишей, гальмуючи розвиток інфаркту міокарда [13], тобто проявляє позитивний вплив на перебіг СНІДу. Здатність α-токоферолу запобігати цитотоксичності різноманітних речовин пов'я-

зують також з активацією ним експресії генів, які відповідають за синтез цитохрому P450, що призводить до прискорення катаболізму ксенобіотиків [14]. Однак такий механізм більшою мірою властивий клітинам печінки, яка має найбільш потужну систему детоксикації і в якій відбуваються основні процеси, що забезпечують біодоступність та метаболізм самого α-токоферолу. Питання про те, чи можливе існування такого механізму в клітинах інших тканин, залишається відкритим.

В експериментах з використанням більш високої концентрації азидотимідину в середовищі (10 ммоль/л), α-токоферол мав менш виражену нормалізуючую дію і лише частково (на 35,4%) відновлював життєздатність тимоцитів (результати не наведені).

Існують численні публікації щодо синергізму дії α-токоферолу й флавоноїду кверцетину. Цей синергізм пов'язують в основному з антиоксидантними властивостями даних сполук [15]. Хоча в літературі існують відомості щодо впливу кверцетину на апоптоз, індукований різноманітними цитотоксичними речовинами, ми не виявили здатності кверцетину підвищувати ступінь виживання тимоцитів на тлі дії азидотимідину (див. рис. 3). Отримані дані свідчать на користь неантиоксидантного механізму впливу α-токоферолу на апоптоз, оскільки антирадикальна активність досліджених сполук є приблизно однаковою [15].

Відомо, що кардіоміопатія, яка розвивається при введенні азидотимідину щурам, супроводжується появою однонитчастих розривів ДНК, що приводить до активації полі-АДФ-рибозилювання та посилення катаболізму $НАД^+$ [4]. З огляду на це ми припустили, що нікотинамід як попередник синтезу $НАД^+$, істотно збільшуючи його концентрацію в клітинах, може бути ефективним протектором клітин стосовно їх загибелі. Однак, як свідчать дані рис. 3, нікотинамід в концентрації 1 ммоль/л, яка є оптимальною для синтезу $НАД^+$ у тимоцитах, не виявляє істотного впливу на життєздатність клітин за дії азидотимідину. Очевидно, що принаймні в тимоцитах зниження пулу $НАД^+$ не є основною причиною цитотоксичності азидотимідину.

Таким чином, одержані нами результати свідчать про те, що препарат групи нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази азидотимідин, який широко використовується в лікуванні хворих на СНІД та в запобіганні розвитку ВІЛ-інфекції, дозозалежно індукує загибель тимоцитів щура за апоптичним шляхом. α-Токоферол, на відміну від кверцитину та $НАД^+$, зменшує цитотоксичність азидотимідину та підвищує життєздатність тимоцитів. Механізм захисної дії α-токоферолу може полягати в запобіганні розвитку дисфункції мітохондрій — основних субклітинних структур, що забезпечують ініціацію та подальший розвиток апоптозу.

Робота виконана згідно з комплексною програмою наукових досліджень НАН України як розділ "Національної програми забезпечення профілактики ВІЛ-інфекції, допомоги та лікування ВІЛ-інфікованих і хворих на СНІД на 2004–2008 роки".

1. *Клінічний* протокол антиретровірусної терапії ВІЛ-інфекції у дорослих та підлітків: Затверджено наказом МОЗ України від 04.10.2006. – № 658. – 82 с.
2. *Garcia-de-la-Asunción J., Gómez-Cambronero L. G., Del Olmo M. L. et al.* Vitamins C and E prevent AZT-induced leukopenia and loss of cellularity in bone marrow. Studies in mice // Free Radic. Res. – 2007. – **41**, No 3. – P. 330–334.
3. *Scruggs E. R., Dirks Naylor A. J.* Mechanisms of Zidovudine-Induced Mitochondrial Toxicity and Myopathy // Pharmacology. – 2008. – **82**, No 2. – P. 83–88.
4. *Szabados E., Fischer G. M., Toth K. et al.* Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – **26**, No 3–4. – P. 309–317.

5. *Jiang B., Hebert V. Y., Li Y. et al.* HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis // Toxicol. and Appl. Pharmacol. – 2007. – **224**, No 1. – P. 60–71.
6. *Dalakas M. C., Illa I., Pezeshkroup G. H. et al.* Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy // N. Engl. J. Med. – 1990. – **322**, No 16. – P. 1098–1105.
7. *Chariot P., Monnet I., Gherardi R.* Cytochrome c oxidase reaction improves histopathological assessment of zidovudine myopathy // Ann. Neurol. – 1993. – No 4. – P. 561–565.
8. *Lynx M. D., McKee E. E.* 3-azido-3-deoxythymidine (AZT) is a competitive inhibitor of thymidine phosphorylation in isolated rat heart and liver mitochondria // Biochem. Pharmacol. – 2006. – **72**. – P. 239–243.
9. *Bradshaw P. C., Li J., Samuels D. C.* A computational model of mitochondrial AZT metabolism // Biochem. J. – 2005. – **392**, No 2. – P. 363–373.
10. *Azzi A.* Molecular mechanism of alpha-tocopherol action // Free Rad. Biol. Med. – 2007. – **43**, No 1. – P. 16–21.
11. *Петрова Г. В., Донченко Г. В., Паршиков О. В.* Вплив кверцетину та α-токоферолу на життєздатність тимоцитів щура за умов інгібування дихального ланцюга мітохондрій // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 2. – С. 29–33.
12. *Li-Weber M., Weigand M. A., Giaisi M. et al.* Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death // J. Clin. Invest. – 2002. – **110**, No 5. – P. 681–690.
13. *Chen Y., Davis-Gorman G., Watson R. R. et al.* Vitamin E attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in murine AIDS // Cardiovasc. Toxicol. – 2002. – **2**, No 2. – P. 119–127.
14. *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 Radic. Biol. Med. – 2007. – **43**, No 10. – P. 1439–1452.
15. *Halliwell B., Rafter J., Jenner A.* Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? // Amer. J. Clin. Nutr. – 2005. – **81**, Suppl. 1. – P. 268S – 276S.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

Надійшло до редакції 10.04.2009

G. V. Petrova, M. M. Veliky,
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

The azidothymidine (zidovudine) cytotoxicity on rat thymocytes. Preventive effect of alpha-tocopherol

Azidothymidine (zidovudine), the first nucleoside analogue of reverse transcriptase inhibitor approved for the treatment of patients with AIDS and HIV infection, caused a dose-dependent increase in the apoptotic cell death of rat culture thymocytes. Alpha-tocopherol treatment decreased toxic effects of azidothymidine and increased the thymocytes survival. The protective effect of alpha-tocopherol on azidothymidine-induced apoptosis of rat thymocytes can be explained by its ability to prevent the mitochondrial dysfunction.