



УДК 577.161.3

© 2009

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

Роль α -токоферола и природных антиоксидантов в апоптозе тимоцитов крысы, индуцированном антимисицином А

Здатність токоферолу ефективно інгібувати індукований антимисицином А апоптоз тимоцитів щура не визначається його антиоксидантними властивостями, а більшою мірою зумовлена тим, що він запобігає дисфункції мітохондрій за рахунок стабілізації мітохондріальних мембран та модуляції біоенергетичних процесів.

Цитопротекторное действие α -токоферола по отношению к широкому спектру проапоптотических веществ [1] предполагает наличие универсального механизма. Бытует мнение, что таковым является антиоксидантный механизм действия α -токоферола, обеспечивающий защиту клеток от оксидативного повреждения активными формами кислорода (АФК), повышенная продукция которых сопровождается инициацией и развитием апоптоза.

Митохондрия является основным продуцентом АФК в клетке при индукции ее гибели как различными проапоптотическими соединениями [2], так и митохондриальными токсинами, действие которых непосредственно направлено на нарушение структуры и функций митохондрий. Одним из них является антибиотик антимисицин А.

Антимисицин А — классический ингибитор цепи транспорта электронов в митохондрии между цитохромами *b* и *c* (комплекс III), вызывает нарушение протонного градиента на внутренней мембране митохондрий, приводящее к повышенной продукции АФК и падению мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). Последнее событие является определяющим в индукции гибели клетки за счет открытия неселективной поры во внутренней мембране митохондрий и выхода в цитозоль проапоптотических факторов [3].

В данной работе приведены результаты исследования влияния α -токоферола, его структурных аналогов — α -токоферилацетата и α -токоферилхинона, убихинона (Q_{10}), а также антиоксидантов кверцетина и N-ацетил-L-цистеина на жизнеспособность тимоцитов крысы и продукцию ними АФК при действии антимисицина А.

Материалы и методы исследований. Опыты проводили на белых крысах-самках с массой тела 100–150 г. Аналогично методике, описанной ранее [4], 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

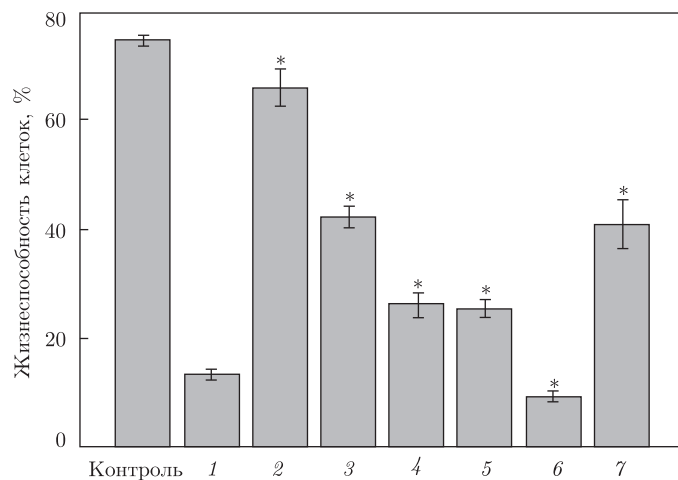


Рис. 1. Жизнеспособность тимоцитов крысы при инкубации с антимицином А и добавлении α -токоферола, его аналогов и природных антиоксидантов.

1 — антимицин А (50 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); 6 — +кверцетин (50 мкмоль/л); 7 — +убихинон (50 мкмоль/л). * — $p < 0,05$ относительно антимицина А

10 ммоль/л Нерес-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 в рутинных экспериментах проводили с использованием 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ-тест). За 100% принимали количество формазана, образовавшегося в аликвоте свежесыведенных интактных тимоцитов.

Содержание АФК в клетке оценивали с использованием 2',7'-дихлорофлуоресциндацетата [5]. Уровень флуоресценции измеряли при длинах волн: возбуждения — 504 нм, эмиссии — 529 нм на спектрофлуориметре LS-50 ("Perkin Elmer", Швейцария). За 100% принимали флуоресценцию аликвоты контрольных тимоцитов.

Антирадикальную активность *in vitro* использованных антиоксидантов определяли по способности восстанавливать радикал 2,2'-азино-ди-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (ABTS*) [6] и рассчитывали по формуле: антирадикальная активность (%) = $[(A_{620\text{контроль}} - A_{620\text{проба}})/A_{620\text{контроль}}] \cdot 100$.

Статистическую достоверность результатов оценивали в программе SigmaPlot2000 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Все исследуемые соединения не влияли на жизнеспособность контрольных клеток (данные не представлены). Антимицин А в концентрации 50 мкмоль/л вызывал значительную гибель тимоцитов (рис. 1). α -Токоферол восстанавливал жизнеспособность тимоцитов практически до контрольного уровня. Действие α -токоферилацетата, убихинона и, особенно, α -токоферилхинона было выражено в меньшей степени. Интересно, что антиоксидант и предшественник глутатиона N-ацетил-L-цистеин, полностью восстанавливающий жизнеспособность тимоцитов при моделировании оксидативного стресса пероксидом водорода и менадионом [7], в случае антимицина

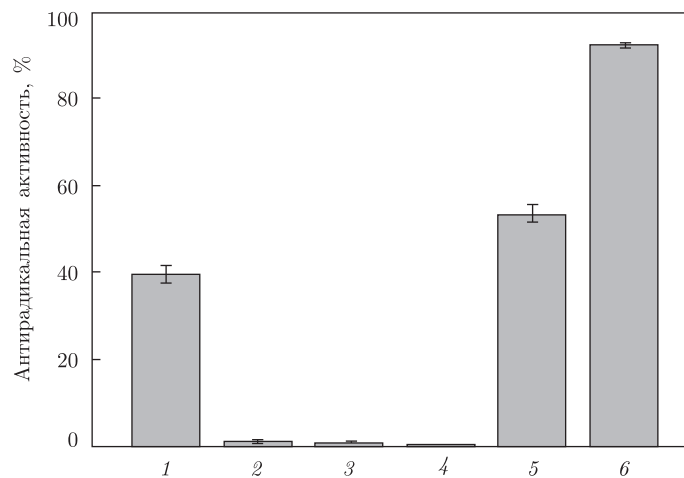


Рис. 2. Антирадикальная активность *in vitro* α-токоферола, его аналогов и природных антиоксидантов. 1 — α-токоферол (100 мкмоль/л); 2 — α-токоферилацетат (100 мкмоль/л); 3 — α-токоферилхинон (100 мкмоль/л); 4 — убихинон (50 мкмоль/л); 5 — кверцетин (50 мкмоль/л); 6 — N-ацетил-L-цистеин (10 ммоль/л)

А проявлял гораздо менее выраженный эффект. Антиоксидант кверцетин не только не восстанавливал, но даже снижал выживаемость клеток.

Способность химических веществ тормозить окислительные свободнорадикальные реакции (антиоксидантная активность) в значительной мере определяется их антирадикальной активностью, т. е. способностью восстанавливать свободные радикалы. Антирадикальная активность α-токоферола *in vitro* составляла 40%. α-Токоферилацетат, не имеющий ОН-группы в 6-м положении хроманового ядра молекулы, определяющей антирадикальные свойства молекулы, а также α-токоферилхинон и убихинон, в которых гидроксил окислен до хинона, не обладали антирадикальной активностью. Способность кверцетина восстанавливать АВТС*-радикалы на 15% превышала таковую для α-токоферола и, наконец, N-ацетил-L-цистеин обладал практически 100% антирадикальной активностью (рис. 2).

Содержание внутриклеточных АФК при действии антимицина А возрастало в два раза (рис. 3). α-Токоферол эффективно ингибировал образование АФК, хотя его аналоги и убихинон, не обладающие антирадикальной активностью *in vitro* (см. рис. 2), также снижали уровень АФК до уровня контроля (см. рис. 3). Кверцетин и N-ацетил-L-цистеин вызывали падение уровня АФК ниже контрольных значений, однако в наименьшей степени восстанавливали жизнеспособность тимоцитов (см. рис. 1). То есть степень ингибирования образования АФК различными антиоксидантами не коррелировала с изменением ими жизнеспособности клеток. Это свидетельствует о том, что повышенное образование АФК является не причиной, а, скорее всего, следствием развития антимицин А-индуцированного апоптоза. Поэтому даже значительное ингибирование образования АФК антиоксидантами не приводит к физиологическому ответу, т. е. в данном случае к восстановлению жизнеспособности тимоцитов. Сходные результаты были получены авторами работы [8], в которой показано, что продукция АФК клетками HeLa при действии антимицина А не коррелирует с их гибелью и эффектом антиоксидантов.

Как уже отмечалось, α-токоферилацетат, α-токоферилхинон и убихинон, не обладающие антирадикальной активностью *in vitro*, при добавлении к тимоцитам эффективно снижают внутриклеточное образование АФК. Нельзя исключить возможность химическо-

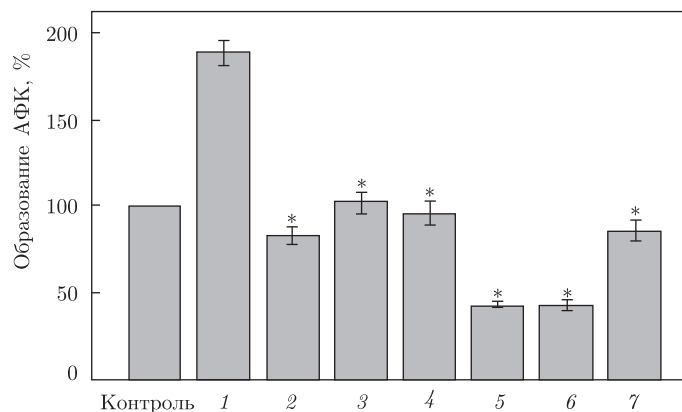


Рис. 3. Внутриклеточное содержание активных форм кислорода при инкубации клеток с антимицином А и добавлении α -токоферола, его аналогов и природных антиоксидантов.

1 — антимицин А (50 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); 6 — +кверцетин (50 мкмоль/л); 7 — +убихинон (50 мкмоль/л). * — $p < 0,05$ относительно антимицина А

го восстановления данных веществ в клетке и проявления ними в восстановленной форме антиоксидантных свойств. В наибольшей степени это справедливо по отношению к убихинону, который в дыхательной цепи митохондрий легко восстанавливается ферментативным путем до убихинола и в таком виде способен проявлять антиоксидантные свойства [9]. Потенциальная возможность восстановления существует и для α -токоферилхинона [10], однако образующийся при этом α -токоферилгидрохинон, хотя и обладает антиоксидантными свойствами, тем не менее не идентичен по структуре α -токоферолу и, очевидно, не способен воспроизводить его специфические функции. Гидролиз эфирной связи в α -токоферилацетате маловероятен (очевидно, в связи с отсутствием в тимоцитах неспецифической эстеразы), поскольку тимоциты высокочувствительны к α -токоферилсукцинату, проапоптотическое действие которого определяется интактностью молекулы [11].

Можно допустить, что ингибирование исследуемыми соединениями апоптоза определяется не столько их антиоксидантной активностью, сколько интеграцией в мембраны митохондрий. Поскольку нарушение барьерных свойств внутренней и наружной митохондриальных мембран является определяющим в гибели клеток, их стабилизация и снижение пассивной проницаемости может предотвращать развитие апоптоза. Показано, что антиапоптотическое действие экзогенного убихинона на антимицин А-индуцированный апоптоз обусловлено его свойствами как структурного элемента митохондриальной мембраны и модулятора неселективной митохондриальной поры, но не как антиоксиданта [12]. Способность снижать проницаемость мембран без проявления антиоксидантных свойств присуща и α -токоферолу [13].

Цитопротекторное действие α -токоферола, α -токоферилхинона и убихинона также может быть связано с их влиянием на биоэнергетические процессы в митохондриях. Существуют данные о взаимодействии и определенной взаимозаменяемости убихинона и α -токоферола, а также α -токоферилхинона [14] как переносчиков электрона в дыхательной цепи митохондрий. Возможность транспорта электрона между α -токоферолом и цитохромом *c* [15] может обеспечивать его перенос в обход заблокированного антимицином А участка цепи, поддерживая тем самым ее нормальное функционирование.

Таким образом, способность α -токоферола эффективно ингибировать апоптоз тимоцитов крысы, индуцированный антимицином А, не определяется его антиоксидантными свойствами, а в большей мере обусловлена предотвращением им дисфункции митохондрий за счет стабилизации митохондриальных мембран и модуляции биоэнергетических процессов.

1. D'Agostini F., Izzotti A., Balansky R. M. et al. Modulation of apoptosis by cancer chemopreventive agents // *Mutat. Res.* – 2005. – **591**. – P. 173–186.
2. Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging // *Cell.* – 2005. – **120**. – P. 483–495.
3. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 99–163.
4. 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.
5. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – **5**, No 2. – P. 227–231.
6. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – **26**, No 9–10. – P. 1231–1237.
7. Петрова Г. В., Донченко Г. В. Роль α -токоферола в оксидативном стрессе тимоцитов крысы, индуцированном пероксидом водорода и менадионом // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 3. – С. 94–102.
8. Han Y. H., Kim S. H., Kim S. Z. et al. Intracellular GSH levels rather than ROS levels are tightly related to AMA-induced HeLa cell death // *Chem. Biol. Interact.* – 2008. – **171**, No 1. – P. 67–78.
9. Alleva R., Tomasetti M., Andera L. et al. Coenzyme Q blocks biochemical but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection // *FEBS Lett.* – 2001. – **503**, No 1. – P. 46–50.
10. Siegel D., Bolton E. M., Burr J. A. et al. The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H: Quinone oxidoreductase: The role of α -tocopherolhydro-quinone as a cellular antioxidant // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – **52**, No 2. – P. 300–305.
11. Петрова Г. В. Проапоптотическое действие токоферилсукцината на тимоциты крысы обусловлено ингибированием сукцинатдегидрогеназы митохондрий // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 4. – С. 86–93.
12. Papucci L., Schiavone N., Witort E. et al. Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, No 30. – P. 28220–28228.
13. Maruoka N., Murata T., Omata N. et al. Effects of vitamin E supplementation on plasma membrane permeabilization and fluidization induced by chlorpromazine in the rat brain // *J. Psychopharmacol.* – 2008. – **22**, No 2. – P. 119–127.
14. Gille L., Rosenau T., Kozlov A. V. et al. Ubiquinone and tocopherol: Dissimilar siblings // *Biochem. Pharmacol.* – 2008. – **76**. – P. 289–302.
15. Maguire J. J., Kagan V. E., Packer L. Electron transport between cytochrome c and alpha tocopherol // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1992. – **188**, No 1. – P. 190–197.

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

Поступило в редакцию 22.12.2008

G. V. Petrova, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. V. Donchenko**

Role of alpha-tocopherol and natural antioxidants in antimycin A-induced apoptosis of rat thymocytes

The ability of alpha-tocopherol to effectively prevent the antimycin A-induced apoptosis of rat thymocytes is not determined by its antioxidant activity, but is largely conditioned by its prevention of mitochondrial dysfunction by means of the stabilization of mitochondrial membranes and a modulation of bioenergetic processes.