

УДК 577.352.38

И. Б. ЗАВОДНИК

**ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ В14
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ,
ИНДУЦИРУЕМОМ ОРГАНИЧЕСКИМ ГИДРОПЕРОКСИДОМ**

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Беларусь,
e-mail: zavodnik_il@mail.ru*

(Поступила в редакцию 27.02.2015)

Введение. Процессы химического и биохимического взаимодействия свободных радикалов, а также окислителей нерадикальной природы с клеточными компонентами постоянно привлекают внимание исследователей. Многочисленные повреждающие эффекты окислительных агентов на молекулярном (окисление белков, перекисное окисление липидов, повреждение ДНК), клеточном (нарушение трансдукции клеточного сигнала, влияние на экспрессию генов) и тканевом (развитие патологии, старение) уровнях хорошо известны. Эти эффекты лежат в диапазоне от тонкой регуляции многочисленных каскадов внутриклеточной сигнализации до индукции мгновенной гибели клетки. Неспецифическая окислительная модификация клеточных структур представляет один из наиболее потенциально опасных процессов для клетки [1]. Генерация радикалов в клетке определяется ее метаболической активностью, концентрацией кислорода, доступностью ионов переходных металлов, уровнем клеточных восстановителей [2].

В качестве модельного окислительного агента в многочисленных исследованиях широко используют органический гидропероксид, *tert*-бутил гидропероксид (tBHP) (водорастворимый аналог гидроперекисей липидов, легко проникающий через клеточную мембрану) [3–6]. Ранее нами исследованы процессы, индуцируемые tBHP в эритроцитах человека [4, 5], митохондриях печени крыс [6].

Повреждающие эффекты tBHP в клетках различных типов хорошо изучены [4–7], известны также механизмы генерации и типы образующихся радикалов [8, 9]. Предполагается, что возможными механизмами цитотоксичности tBHP являются нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза и Ca²⁺-сигнализации [7], которое следует за окислением восстановленного глутатиона (GSH, важнейшего редокс-регулятора в клетке), окисление белковых тиолов клетки, восстановленных пиридиннуклеотидов, образование двойных и одиночных разрывов в молекулах ДНК [10, 11], перекисное окисление мембранных липидов [12], возрастание внутриглобулярной подвижности мембранных белков [13]. Ранее было показано, что метаболизм гидропероксида приводит к резкому возрастанию содержания окисленной формы глутатиона (GSSG) и нарушению редокс-баланса GSH/GSSG в клетке [14], что является причиной выхода цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, изменения уровня экспрессии про/антиапоптатических белков Bax/Bcl 2 и кинетически связано с активацией каспазы-3 [14]. Эти процессы в итоге приводят к апоптотической гибели клеток [14]. Экспонирование клеток tBHP вызывает целый ряд токсических событий в клетке: ингибирование клеточной пролиферации, морфологические трансформации, диссипа-

цию митохондриального мембранного потенциала, нарушение респираторной функции, формирование митохондриальных пор высокой проницаемости, гибель клетки по некротическому или апоптотическому механизму [4–6, 13, 15]. В то же время клеточные мишени, в первую очередь взаимодействующие с окислителем, последовательность событий от окислительной модификации первичной мишени до гибели клетки, механизмы окислительных процессов, факторы антиоксидантной защиты требуют дальнейшего изучения.

Цель настоящей работы – определение биохимических закономерностей окислительных процессов, индуцируемых tBHP, в клетках млекопитающих.

Материалы и методы исследования. *Реактивы и клеточные культуры.* В работе использовали tBHP (Sigma-Aldrich GmbH, Германия), флуоресцентный зонд 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) (Molecular Probes, Inc., США), а также другие реактивы аналитической степени чистоты (POCH, Польша). Растворы готовили, используя воду, очищенную с помощью системы Milli-Q. Клетки линии B14 китайского хомячка выращивали в монослое в сбалансированной солевой среде Хэнкса, содержащей 10 мМ глюкозы (HBSS-глюкоза), pH 7,4, и 10 %-ную сыворотку новорожденных телят. Культуры клеток выращивали в увлажненной атмосфере воздуха, содержащей 5 % CO₂, при 37 °С. Перед экспериментом экспоненциально растущие клетки суспензировали при помощи 0,1 %-ного трипсина, дважды промывали средой и помещали в свежеприготовленную среду HBSS-глюкоза (500 000 клеток/мл).

Генерация свободных радикалов. Образование свободных радикалов регистрировали по интенсивности флуоресценции зонда DCFH-DA, широко используемого для оценки количества образующихся внутриклеточных радикалов [16]. Нефлуоресцирующий DCFH-DA в клетке деацетируется эстеразами до нефлуоресцирующего DCFH, который реагирует с активными формами кислорода/азота, окисляясь до интенсивно флуоресцирующего 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF). Известно, что DCFH непосредственно взаимодействует с гидроксильными радикалами, оксидом азота, пероксинитритом, реактивными формами кислорода, образующимися в системе H₂O₂-Fe²⁺, но не с супероксиданионом [16–18]. При отсутствии специфичности следует с осторожностью интерпретировать результаты окисления DCFH-DA в биологических системах, но в то же время это позволяет рассматривать зонд как удобный индикатор общего количества образующихся активных форм кислорода/азота [16–18]. В предварительных экспериментах нами показано отсутствие в бесклеточной системе прямого окисления деацетилизованного DCFH tBHP. Клетки линии B14 (500 000 клеток/мл) инкубировали в присутствии DCFH-DA (4 мкМ) в среде HBSS-глюкоза при 37 °С в течение 20 мин. Флуоресценцию зонда регистрировали с помощью спектрофлуориметра Perkin Elmer LS55 (Германия), экспонируя клетки различным концентрациям tBHP в течение разных промежутков времени при разных температурах.

Морфология клеток. Морфологические изменения клеток линии B14 регистрировали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E400 (Япония) при 500-кратном увеличении, используя прикрепленные клетки, которые помещали в свежую среду HBSS-глюкоза, содержащую различные концентрации tBHP. Время экспонирования 1 ч при 37 °С.

Результаты представляли как среднее значение 5–6 измерений ± SD. Для оценки результатов, демонстрирующих нормальное распределение (согласно тесту Шапиро–Вилка), использовали *t*-критерий Стьюдента, а также пакет программ GraphPad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/con-tMenu/>).

Результаты и их обсуждение. Клетки линии B14 китайского хомячка широко используются в исследованиях механизмов действия окислителей, антиоксидантов, токсических агентов [11, 19, 20]. Нами установлено, что в клетках линии B14 содержание GSH составляет 2,4 ± 0,3 мМ. GSH образует первую линию защиты от пероксидов в клетке и быстро истощается при экспонировании клеток линии B14 tBHP (данные не представлены). Интенсивность окислительных процессов в клетках линии B14, которая определяется уровнем антиоксидантной защиты и метаболической активностью клетки, оценивали по интенсивности флуоресценции зонда DCF, пропорциональной количеству образующихся в присутствии окислителя (tBHP) активных форм кислорода. На рис. 1 представлены кинетические кривые образования радикалов при различных температурах экспонирования клеток окислителю. Обращает на себя внимание тот факт, что

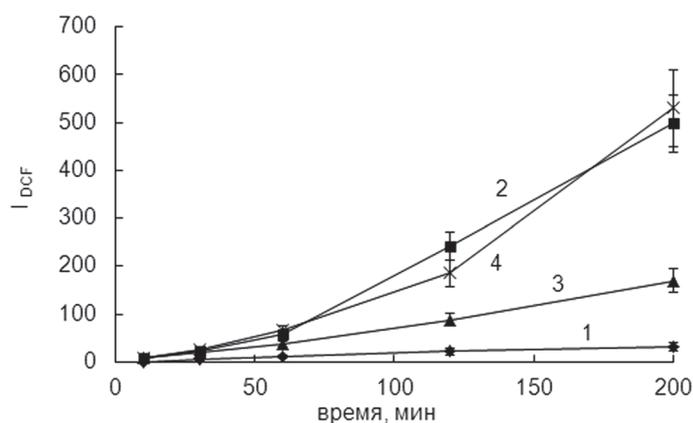


Рис. 1. Образование активных форм кислорода клетками линии В14 китайского хомячка при экспонировании органическому гидропероксиду tBHP (100 мкМ) при различных температурах: 1 – 12 °С, 2 – 28 °С, 3 – 37 °С, 4 – 48 °С (500 000 клеток/мл, HBSS–глюкоза, рН 7,4, концентрация флуоресцентного зонда DCFDA–DA – 4 мкМ, преинкубация зонда в суспензии клеток – 20 мин)

в исследуемом диапазоне температур скорость процесса генерации радикалов минимальна при 37 °С, что, вероятно, отражает максимальную активность ферментных систем, метаболизирующих tBHP, в первую очередь глутатионпероксидазы. С помощью уравнения Аррениуса $k = A \exp(-E_a/RT)$ (где k – константа скорости реакции, A – коэффициент, E_a – энергия активации реакции окисления DCFH-DA, R – универсальная газовая постоянная, T – температура), отражающего зависимость константы скорости реакции от температуры, нами оценено кажущееся значение энергии активации процесса генерации радикалов в диапазоне 5–28 °С, которое равно $112,9 \pm 14,3$ кДж/моль. Ранее нами установлено, что энергия активации реакции взаимодействия tBHP с гемоглобином эритроцитов человека составила 108 ± 16 кДж/моль [4]. Вероятнее всего, активация tBHP в клетке происходит при его взаимодействии с гемсодержащими белками и ферментами, цитохромами P450 эндоплазматического ретикулума и цитохромами *c* митохондрий [8, 9, 21, 22].

В настоящее время для описания процесса взаимодействия гемсодержащих белков и ферментов с органическими гидроперекисями предложено несколько схем, включая пероксидазный механизм и гомолитическое расщепление гидроперекиси [8, 9]. В случае взаимодействия Fe^{3+} -гематина с tBHP предполагают, что алкоксильный радикал, образуемый в результате гомолитического расщепления O–O связи гидроперекиси, является первичным радикалом [9]. Известно, что взаимодействие tBHP с митохондриями приводит к генерации метильного, *tert*-бутильного и *tert*-

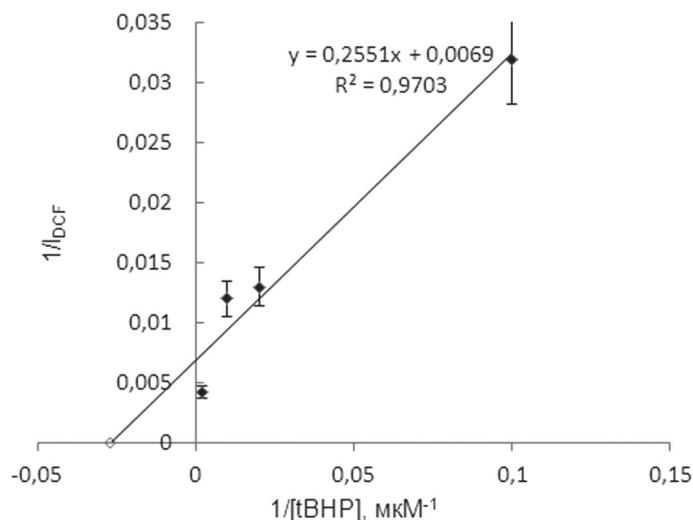


Рис. 2. Взаимодействие органического гидропероксида tBHP с клетками линии В14 китайского хомячка (500 000 клеток/мл, HBSS–глюкоза, рН 7,4, 37 °С, концентрация флуоресцентного зонда DCFDA–DA – 4 мкМ, преинкубация зонда в суспензии клеток – 20 мин (график двойных обратных координат))

бутилпероксильного радикалов в результате прямого восстановления химического окислителя цитохромом *c1* и/или цитохромом *c* дыхательной цепи митохондрий [21]. Показано, что первый этап tBHP-индуцируемой реакции представляет гомолитическое расщепление гидропероксида комплексом цитохром *c*/кардиолипин [22]. С другой стороны, восстановление гидропероксида (как и гидроперекисей мембранных липидов) системой глутатионпероксидаза/глутатионредуктаза нарушает редокс-баланс клетки и клеточных органелл [23]. С помощью графика двойных обратных координат (график Лайнуивера–Бэрка) для представления зависимости количества образованных активных форм кислорода от концентрации окислителя нами рассчитано значение эффективной полумаксимальной концентрации tBHP в реакции активации окислительного агента клетками линии В14 при 37 °С: $EC_{50} = 37 \pm 12$ мкМ (рис. 2), что отражает достаточно высокое сродство органического гидропероксида к клеточным компонентам.

Экспонирование клеток линии В14 органическому гидропероксиду приводит к выраженному нарушению морфологии клеток (рис. 3). Клетки линии В14 характерной биполярной формы теряют способность сорбироваться на субстрате и образовывать клеточные ассоциаты, приобретают сферическую форму и сжимаются уже при концентрации окислителя 100 мкМ. При более высоких концентрациях окислителя (500–1000 мкМ) сжатие, напротив, сменяется выраженным набуханием клеток с последующим разрушением их мембраны и лизисом. В независимых экспериментах нами обнаружена полная деполаризация клеток линии В14 при экспонировании окислителю. Мембранный потенциал уменьшался от $(-23,7 \pm 3,4)$ мВ для контрольных клеток до 0 при концентрации tBHP 1000–1500 мкМ, что отражает полное нарушение асимметричного распределения ионов K^+ и Na^+ по обе стороны клеточной мембраны и приводит к набуханию клеток. Истечение ионов K^+ из клетки и входение ионов Na^+ , как и набухание клеток, связано с некротическим механизмом гибели клеток [24].

Заключение. Окислительный стресс, индуцируемый в клетках линии В14 органическим гидропероксидом, приводит к генерации активных форм кислорода в реакциях гидропероксида с гемсодержащими белками. Рассчитана эффективная полумаксимальная концентрация tBHP в реакции активации окислителя клетками: $EC_{50} = 37 \pm 12$ мкМ. Определяемые метаболической активностью клетки окислительные процессы приводят к потере клетками способности сорбироваться на субстрате и формировать ассоциаты, а затем к набуханию клеток и лизису. Деполаризация и набухание клеток отражают формирование ион-неселективных пор в мембране и некротический механизм гибели клеток при окислительном воздействии.

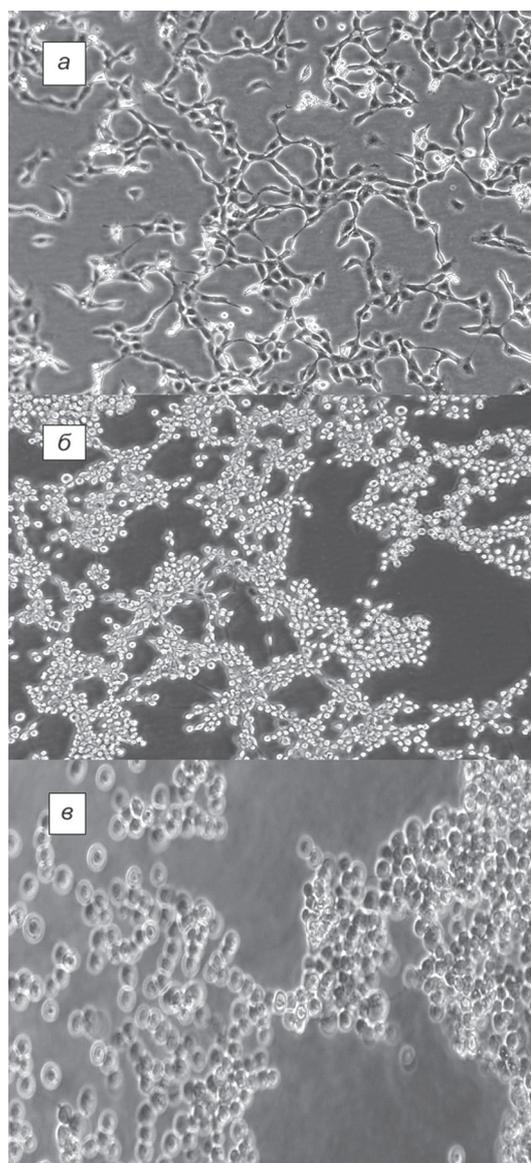


Рис. 3. Морфологические трансформации клеток линии В14 китайского хомячка при экспонировании различным концентрациям tBHP (*a* – контроль, *б* – 100 мкМ tBHP, *в* – 500 мкМ tBHP). Клетки обрабатывали окислительным агентом в течение 1 ч при 37 °С (HBSS–глюкоза, pH 7,4)

Література

1. Sies H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London: Academic Press, 1991. P. 15–22.
2. Saran M., Bors W. // Radiat. Environ. Biophys. 1990. Vol. 29. P. 249–262.
3. Aherne S. A., O'Brien N. M. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 29. P. 507–514.
4. Доманский А. В., Лапицина Е. А., Заводник И. Б. // Биохимия. 2005. Т. 70, № 7. С. 922–932.
5. Дремза И. К., Судникович Е. Ю., Заводник И. Б. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2006. № 4. С. 90–94.
6. Zavadnik I. B., Dremza I. K., Cheshchevik V. T. et al. // Life Sci. 2013. Vol. 92. P. 1110–1117.
7. Choi I., Liu R.-M., Forman H. J. // Biochem. Pharm. 1997. Vol. 53. P. 987–993.
8. Barr D. P., Martin M. V., Guengerich F. P., Mason R. P. // Chem. Res. Toxicol. 1996. Vol. 9. P. 318–325.
9. Van der Zee J., Barr D. P., Mason R. P. // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20. P. 199–206.
10. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
11. Bryszewska M., Piasecka A., Zavadnik I. B. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1621. P. 285–291.
12. Fraga C., Tappel A. L. // Biochem. J. 1988. Vol. 252. P. 893–896.
13. Mazhul V., Shcherbin D., Zavadnik I. et al. // Cell. Biol. Inter. 1999. Vol. 23. P. 345–350.
14. Pias E. K., Aw T. Y. // Cell Death Differ. 2002. Vol. 9. P. 1007–1016.
15. Sestili P., Brambilla L., Cantoni O. // FEBS Lett. 1999. Vol. 457. P. 139–143.
16. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. // Chem. Res. Toxicol. 1992. Vol. 5. P. 227–231.
17. Murrant C. L., Reid M. B. // Microscopy Res. and Technique. 2001. Vol. 55. P. 236–248.
18. Bonini M. G., Rota C., Tomasi A., Mason R. P. // Free Radic. Biol. Med. 2006. Vol. 40, N 6. P. 968–975.
19. Labieniec M., Gabryelak T. // Mutat. Res. 2003. Vol. 539. P. 127–135.
20. Czepas J., Koceva-Chyła A., Gwoździński K., Joźwiak Z. // Cell Biol. Toxicol. 2008. Vol. 24, N 1. P. 101–112.
21. Kennedy C. H., Chirch D. E., Winston G. W., Pryor W. A. // Free Radic. Biol. Med. 1992. Vol. 12, N 5. P. 381–387.
22. Belikova N. A., Tyurina Y. Y., Borisenko G. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, N 32. P. 11288–11289.
23. Greco T., Fiskum G. J. // Bioenerg. Biomembr. 2010. Vol. 42, N 6. P. 491–497.
24. Barros L. F., Hermosilla T., Castro J. // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2001. Vol. 130. P. 401–409.

I. B. ZAVODNIK

REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION AND B14 CELLS MORPHOLOGICAL TRANSFORMATIONS UNDER OXIDATIVE TREATMENT BY ORGANIC HYDROPEROXIDE

Summary

Oxidative stress induced in B14 cells by organic *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) results in intracellular free radical generation in hydroperoxide reactions with haem-containing proteins. The half maximal effective concentration of tBHP in reaction with cellular components EC₅₀ is equal to 37 ± 12 μM. Oxidative processes depends on cell metabolic activity and induces cell morphological impairments: cell detachment from the substrate, cell dissociations and swelling, which reflects necrotic mechanism of oxidative cell death.