



УДК 577.161.3

Г. В. Петрова, член-корреспондент НАН України Г. В. Донченко,
Е. П. Клименко

Эффекты α -токоферола и его производных на содержание NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы 1 в тимоцитах крыс

Цитотоксическое действие на тимоциты крысы короткоцепочечных производных α -токоферола и α -токоферилсукцината сопровождается протеолитической деградацией DT-диафоразы. Цитопротекторное действие α -токоферола не связано с изменением содержания энзима.

NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза 1 (DT-диафораза, NQO1, 1.6.99.2) — цитозольный гомодимерный флавопротеин — участвует, по крайней мере, в трех системах биохимических реакций: одноступенчатом двуэлектронном восстановлении хинонов (без промежуточной стадии образования токсичных семихинонов) до гидрохинонов, поддержании в восстановленной активной форме эндогенных антиоксидантов, регуляции стабильности опухолевого супрессора и проапоптического фактора белка p53 [1]. Такой широкий спектр проявления биологической активности позволяет DT-диафореze участвовать в регуляции процессов антиоксидантной защиты, детоксикации ксенобиотиков и запрограммированной гибели клеток. Помимо этого, повышенная активность энзима в клетках раковых опухолей (по сравнению с соответствующими нормальными тканями) настолько характерна, что послужила толчком к созданию целого класса химиотерапевтических соединений, биоактивация которых обеспечивается DT-диафоразой [2].

Физиологические колебания активности DT-диафоразы находятся в довольно широких пределах, причем существует целый ряд биологически активных соединений (антиоксиданты, полифенолы, сульфидные компоненты, фармацевтические препараты и т. п.), которые способны существенным образом ее изменять. Однако в литературе практически отсутствуют данные о содержании DT-диафоразы при индукции гибели клеток и действии α -токоферола и его производных.

Цель работы — вестерн-блот анализ содержания DT-диафоразы в тимоцитах крысы при индукции их гибели и действии α -токоферола, его аналогов и синтетических производных.

© Г. В. Петрова, Г. В. Донченко, Е. П. Клименко, 2014

Материалы и методы исследований. Опыты проводили на белых крысах-самках с массой тела 100–150 г. Согласно стандартной методике были получены тимоциты, подсчитано их количество и определена жизнеспособность клеток (по исключению витального красителя трипанового синего), которая составляла не менее 97%. Около $8 \cdot 10^6$ клеток ресуспендировали в среде RPMI-1640 (из расчета $2 \cdot 10^6$ клеток/мл), содержащей 10 ммоль/л Hepes-NaOH буфер (pH 7,3), 0,1% БСА, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкмоль/л β -меркаптоэтанола. Исследуемые соединения добавляли из концентрированных маточных растворов в этаноле или диметилсульфоксиде, предварительно разведенными культуральной средой так, чтобы конечная концентрация органических растворителей не превышала 0,2%. Соответствующее количество растворителей добавляли к тимоцитам в контроле. Клетки инкубировали при 37 °C в течение 18 ч, после чего осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин) и отмывали физиологическим раствором, забуференным фосфатом (в ммоль/л: NaCl 136,9; KCl 2,7; Na_2HPO_4 8,1; KH_2PO_4 1,5; pH 7,2).

Лизирование клеток проводили их инкубированием 30 мин при 4 °C в растворе, содержащем 10 ммоль/л трис-HCl буфер (pH 7,4), 150 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л EDTA, 5 ммоль/л пироглутамат натрия, 50 ммоль/л NaF, 0,1% Na-SDS, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолевой кислоты, 0,5 ммоль/л PMSF и 5 мкл/мл полной смеси ингибиторов протеаз (“Sigma”, США). После центрифугирования 10 мин при 15 000 g (4 °C) в надосадочной жидкости определяли содержание общего белка с использованием реагента бицинхониновой кислоты согласно протоколу фирмы-производителя (“Sigma”, США).

Электрофоретическое разделение белков (30 мкг общего белка лизата на лунку геля) осуществляли в 12,5% ПААГ — 0,2 моль/л трис-ацетатный буфер (pH 7,0). В качестве электродного буфера использовали раствор 50 ммоль/л трис — 50 ммоль/л трицин (pH 8,2) — 0,1% SDS — 1,3 ммоль/л сульфит натрия [3]. Электродный буфер для переноса белков на PVDF-мембраны (Immobilon-P, “Millipore”, США) содержал 25 ммоль/л трис, 192 ммоль/л глицин (pH 8,3), 10% метанол. Мембраны инкубировали 1 ч в блокирующем растворе, содержащем 20 ммоль/л трис-HCl буфер (pH 7,5), 150 ммоль/л NaCl, 0,05% Твин-20 (TBS-T), 5% обезжиренное сухое молоко. Затем следовали: инкубация 1 ч с антителами против DT-диафоразы и актина (“Sigma”, США; разведение соответственно 1 : 2000 и 1 : 1000 в TBS-T — 3% 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 мембран TBS-T три раза по 10 мин. Визуализировали сигнал методом усиленной хемилюминесценции.

Денситометрию проводили с помощью компьютерной программы TotalLab 120, данные представлены как % от соответствующих значений контроля.

Результаты исследований и их обсуждение. Уровень активности DT-диафоразы у млекопитающих выявляет широкую видовую и органную специфичность. Нами установлено, что тимоциты крысы стабильно экспрессируют фермент в количестве, достаточном для обнаружения с помощью вестерн-блот анализа (рис. 1). α -Токоферол, его ацильное производное α -токоферилацетат и окисленная форма α -токоферилхинон (см. рис. 1, а–в) в диапазоне концентраций 10–100 мкмоль/л не влияют на уровень экспрессии DT-диафоразы. Известно, что α -токоферол увеличивает активность DT-диафоразы в тимоцитах крысы [4] и в клетках рака толстого кишечника линии Colo205 [5]. С учетом полученных данных можно заключить, что активация DT-диафоразы α -токоферолом (по крайней мере, в слу-

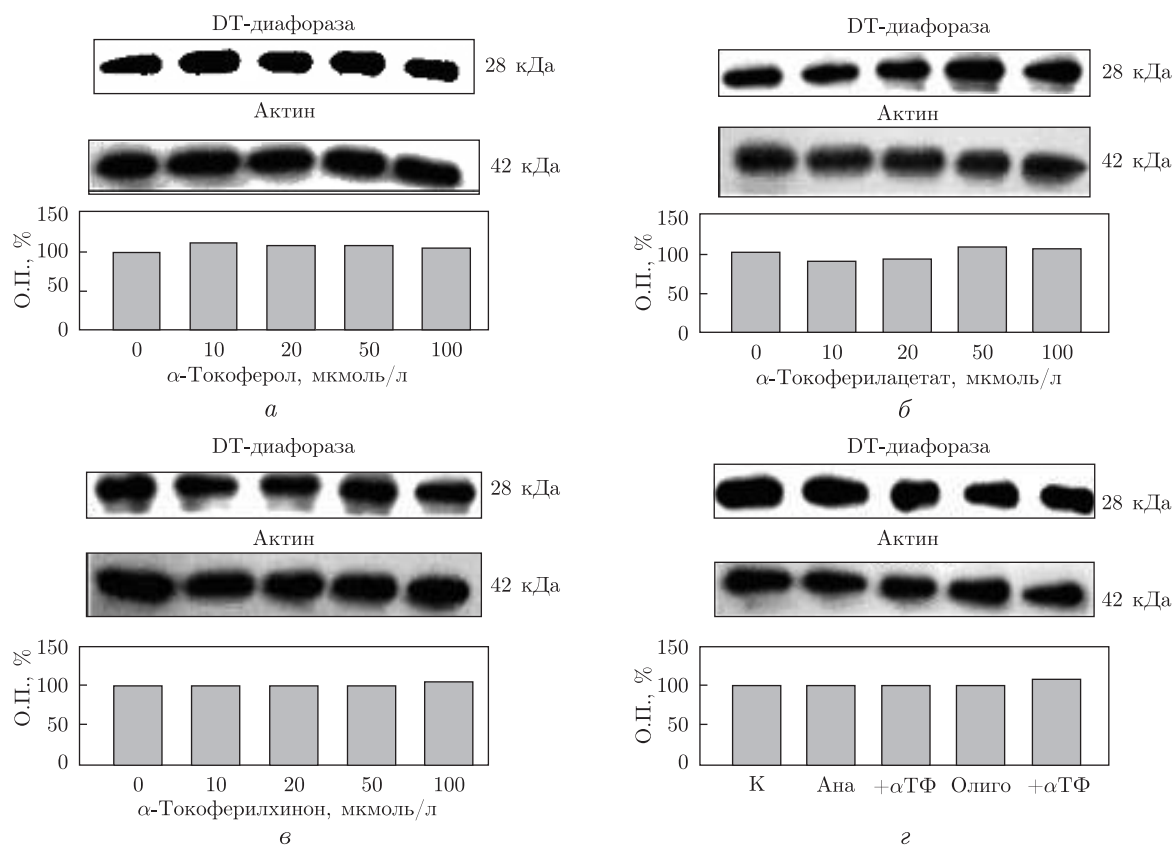


Рис. 1. Содержание ДТ-диафоразы в тимocyтах крыс при добавлении α -токоферола (а), α -токоферилацетата (б), α -токоферилхинона (в), а также при инкубации клеток с 50 мкмоль/л антимицином А (Ана), 10 мкг/мл олигомицином (Олиго) и дополнительном внесении α -токоферола (α ТФ) в концентрации 100 мкмоль/л (з)

чае тимocyтов) не обусловлена увеличением количества молекул энзима. Существование множественных уровней регуляции для ДТ-диафоразы подтверждается и другими исследователями [6].

Ранее нами было установлено, что митохондриальные токсины антимицин А и олигомицин индуцируют соответственно апоптоз и некроз тимocyтов крыс, которые эффективно предотвращаются α -токоферолом [7]. Как видно из приведенных данных (см. рис. 1, з), ни гибель тимocyтов под действием указанных соединений, ни цитопротекторное действие α -токоферола не сопровождаются изменением содержания ДТ-диафоразы в клетках. Из этого следует, что модуляция α -токоферолом активности ДТ-диафоразы в данном случае осуществляется на посттрансляционном уровне.

Известно, что, в отличие от α -токоферола, проявляющего цитопротекторное действие по отношению к различным типам клеток при индукции их гибели, его природные аналоги (β -, δ -, γ -токоферолы и соответствующие токотриенолы) и синтетические производные оказывают цитотоксическое действие как на нормальные, так и на трансформированные клетки в культуре [8]. Мы использовали три синтетические производные α -токоферола, боковая цепь которых укорочена с 16 до 6 атомов углерода — α -токоферол-С₆, α -токоферилацетат-С₆ и α -токоферилхинон-С₆ (короткоцепочечные производные). Кроме того, был исследован известный индуктор апоптоза [8] α -токоферилсукцинат.

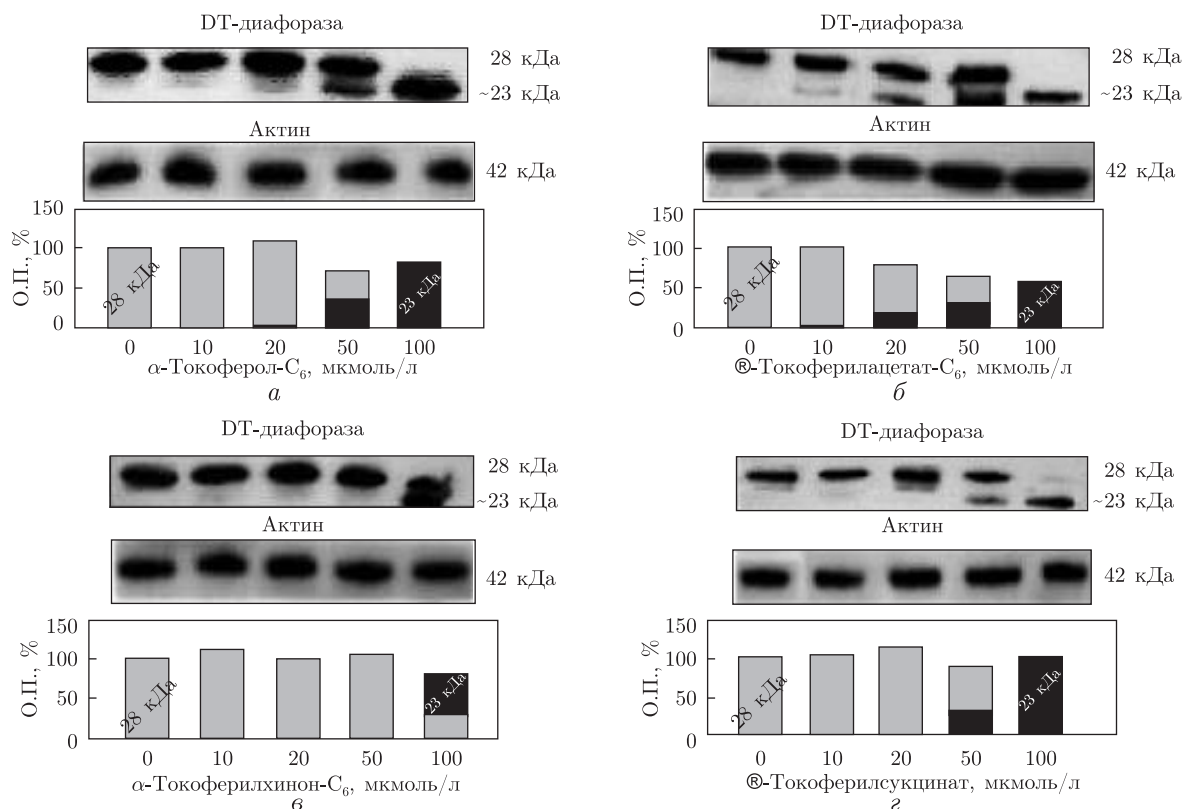


Рис. 2. Содержание ДТ-диафоразы в тимocyтaх крыс при добавлении α -токоферола- C_6 (а), α -токоферил-ацетата - C_6 (б), α -токоферилхинона- C_6 (в) и α -токоферилсукцината (з)

Нами впервые установлено (рис. 2), что указанные соединения не влияют на содержание ДТ-диафоразы в тимocyтaх крыс, однако вызывают дозозависимую протеолитическую деградацию молекулы энзима путем отщепления фрагмента с молекулярной массой около 5 кДа. Эффект α -токоферилхинона- C_6 выражен в наименьшей степени и проявляется лишь при его концентрации 100 мкмоль/л (см. рис. 2, в). Отметим, что именно в диапазоне концентраций 50–100 мкмоль/л короткоцепочечные производные [9] и α -токоферилсукцинат [10] индуцируют гибель тимocyтoв крыс соответственно по некротическому и апоптическому пути.

Специфический протеолиз — один из наиболее характерных для апоптоза биохимических процессов — обеспечивается сложной, многоступенчатой активацией специфических для апоптоза протеаз — каспаз. В случае индукции апоптоза тимocyтoв антимицином А, при котором наблюдается активация каспазы-3 [7], нами не обнаружен протеолиз ДТ-диафоразы (см. рис. 1, з).

Однако некроз тимocyтoв при действии короткоцепочечных производных α -токоферола [9] сопровождается выраженной деградацией молекул энзима (см. рис. 2, а–в). Поскольку активация каспаз характерна для апоптической, но не для некротической гибели клеток, можно предположить, что протеолиз ДТ-диафоразы катализируется иными энзимами. Наиболее вероятным представляется участие в данном процессе протеолитических энзимов лизосом — катепсинов. Данные литературы о существовании формы гибели клеток, которая зависима от лизосом и опосредствуется пермеабиллизацией их мембран и выходом в цитозоль

клетки катепсинов [11], а также установленный нами ранее факт нарушения короткоцепочечными производными интеграции мембран лизосом [9] свидетельствуют о правомерности данного допущения.

Открытым остается вопрос о том, является ли обнаруженный феномен характерным только для некроза и специфичным лишь для соединений, обладающих сходной с α -токоферолом структурой, либо же этот эффект присущ и другим соединениям, механизм цитотоксического действия которых подобен такому для производных α -токоферола. Так, с одной стороны, индуцируемая олигомицином некротическая гибель тимоцитов не сопровождается протеолизом ДТ-диафоразы (см. рис. 1, *з*), а с другой — деградация энзима сопутствует проапоптическому действию α -токоферилсукцината (см. рис. 2, *з*). По нашему мнению, наиболее вероятным представляется второе допущение. При этом одним из механизмов, определяющим цитотоксичность подобного рода соединений, можно считать их способность нарушать интеграцию мембран субклеточных структур, в частности лизосом. В качестве аргумента приведем тот факт, что не только короткоцепочечные производные α -токоферола [12], но и другие цитотоксические соединения (например, химиотерапевтический препарат тамоксифен [13]) обладают гемолитической активностью, что свидетельствует об их способности к прямой дезинтеграции мембран. С этих позиций отсутствие протеолитической деградации ДТ-диафоразы в случае олигомицина, очевидно, определяет тот факт, что основным механизмом его пронекротического действия является связывание с Fo-субъединицей в составе митохондриальной F1Fo-АТФазы, что приводит к ее ингибированию и, как результат, снижению синтеза АТФ. В то же время, несмотря на то что проапоптическое действие α -токоферилсукцината определяется в большей мере нарушением функционирования митохондрий [8], происходит также дестабилизация мембран лизосом, а клетки, дефицитные по лизосомальному энзиму катепсину D, устойчивы к проапоптическому действию α -токоферилсукцината [14].

Несмотря на цитотоксичность для тимоцитов α -токоферилхинона-С₆ [9], он единственный из исследуемых соединений не обладает гемолитической активностью [12] и, следовательно, прямым мембранодестабилизирующим действием. Однако выраженные прооксидантные свойства α -токоферилхинона-С₆ [12] могут обуславливать вторичное оксидативное повреждение мембран субклеточных структур. Кроме того, α -токоферилхинон-С₆ является потенциальным субстратом для ДТ-диафоразы [15], которая, катализируя его восстановление до нетоксичного гидрохинона, тем самым может снижать концентрацию α -токоферилхинона-С₆ в клетке. Именно этим, по нашему мнению, объясняется тот факт, что протеолиз ДТ-диафоразы при действии α -токоферилхинона-С₆ наблюдается лишь при его относительно высокой концентрации — 100 мкмоль/л (см. рис. 2, *в*).

Таким образом, цитотоксическое действие на тимоциты крысы короткоцепочечных производных α -токоферола и α -токоферилсукцината сопровождается протеолитической деградацией ДТ-диафоразы. Цитопротекторное действие α -токоферола не связано с изменением содержания энзима.

1. *Dinkova-Kostova A. T., Talalay P.* NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – **501**. – P. 116–123.
2. *Danson S., Ward T. H., Butler J. et al.* DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs // *Cancer Treat. Rev.* – 2004. – **30**. – P. 437–449.
3. *Cubillos-Rojas M., Amair-Pinedo F., Tato I. et al.* Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass using Tris-acetate polyacrylamide gels // *Electrophoresis.* – 2010. – **31**. – P. 1318–1321.

4. Петрова Г. В., Донченко Г. В. Цитотоксичність троглитазона – структурного аналога α -токоферола – опосередується інгибуванням NAD(P)H-хиноноксидоредуктази // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 4. – С. 105–111.
5. Wang W., Higuchi C. M. Induction of NAD(P)H: quinone reductase by vitamins A, E and C in Colo205 colon cancer cells // Cancer Lett. – 1995. – **98**, No 1. – P. 63–69.
6. Vomhof-DeKrey E. E., Picklo M. J. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 activity reduces hypertrophy in 3T3-L1 adipocytes // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – **53**. – P. 690–700.
7. Петрова Г. В. α -Токоферол предотвращает гибель тимоцитов крыс, индуцированную антимицином А и олигомицином // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 2. – С. 85–92.
8. Zhao Y., Neuzil J., Wu K. Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: From the bench to the bedside? // Mol. Nutr. Food Res. – 2009. – **53**. – P. 129–139.
9. Петрова Г. В., Донченко Г. В. Цитотоксическое действие короткоцепочечных производных витамина Е на тимоциты крысы // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 4. – С. 77–83.
10. Петрова Г. В. Проапоптическое действие α -токоферилсукцината на тимоциты крысы обусловлено ингибированием сукцинатдегидрогеназы митохондрий // Там само. – 2006. – **78**, № 4. – С. 104–111.
11. Johansson A. C., Appelqvist H., Nilsson C. et al. Regulation of apoptosis associated lysosomal membrane permeabilization // Apoptosis. – 2010. – **15**, No 5. – P. 527–540.
12. Петрова Г. В. Мембранотропные и прооксидантные свойства короткоцепочечных производных α -токоферола // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 4. – С. 39–45.
13. Cruz Silva M. M., Madeira V. M., Almeida L. M. et al. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis // Toxicol. In Vitro. – 2001. – **15**. – P. 615–622.
14. Neuzil J., Zhao M., Ostermann G. et al. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumor activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability // Biochem. J. – 2002. – **362**. – P. 709–715.
15. 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 -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant // Mol. Pharmacol. – 1997. – **52**, No 2. – P. 300–305.

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

Поступило в редакцию 22.10.2013

Г. В. Петрова, член-корреспондент НАН України **Г. В. Донченко**,
К. П. Кліменко

Ефекти α -токоферолу і його похідних на вміст NAD(P)H-хіноноксидоредуктази 1 у тимocyтах щурів

Цитотоксична дія на тимocyти щурів коротколанцюгових похідних α -токоферолу й α -токоферилсукцинату супроводжується протеолітичною деградацією DT-діафори. Цитопротекторна дія α -токоферолу не пов'язана зі зміною вмісту ензиму.

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

Effects of α -tocopherol and its derivatives on the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 level in rat thymocytes

The cytotoxic effects of α -tocopherol short-chain derivatives and α -tocopherylsuccinate on rat thymocytes are accompanied by the proteolytic degradation of DT-diaphorase. The cytoprotective effect of native α -tocopherol is not associated with an increased level of the enzyme.