

## ПРООКСИДАНТНОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ГЛУТАТИОНА В СОЧЕТАНИИ С ВИТАМИНОМ В<sub>12b</sub>

© М. Е. Соловьева, В. В. Соловьев, А. А. Фасхутдинова, А. А. Кудрявцев, В. С. Акатов

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино;  
электронный адрес: groupakotov@rambler.ru*

Исследовали прооксидантное и цитотоксическое действие тиолов N-ацетилцистеина (НАС) и глутатиона (GSH) в сочетании с витамином В<sub>12b</sub>. Показано, что тиолы GSH или НАС в физиологических концентрациях при совместном применении с В<sub>12b</sub> инициируют апоптоз. Установлено прооксидантное действие НАС (или GSH) совместно с В<sub>12b</sub>, выражающееся в генерации и накоплении перекиси водорода во внеклеточной среде, что вызывает внутриклеточный окислительный стресс и нарушение редокс-баланса клеток. Обнаруженные эффекты полностью предотвращаются нетиоловыми антиоксидантами — каталазой и пируватом. Хелаторы железа фенантролин и дефероксамин не препятствуют накоплению перекиси водорода в среде, но ингибируют гибель клеток, вызываемую совместным действием НАС и В<sub>12b</sub> или GSH и В<sub>12b</sub>. Таким образом, тиолы-антиоксиданты GSH или НАС при сочетанном применении с витамином В<sub>12b</sub> проявляют прооксидантные свойства, вызывая при участии внутриклеточного железа апоптотическую гибель опухолевых клеток.

Ключевые слова: антиоксиданты, витамин В<sub>12b</sub>, глутатион, N-ацетилцистеин, окислительный стресс, апоптоз, опухолевые клетки.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, DCFHDA — 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, DFO — дефероксамин мезилат, GSH — восстановленный глутатион, НАС — N-ацетилцистеин.

Тиолсодержащие соединения играют важную роль в защите белков клетки от окислительного стресса, в восстановлении их дисульфидных групп. Тиолы широко применяются в медицине как радиопротекторы и антиоксиданты, в лечении пневмотоксичности, ревматоидного артрита, при передозировке ацетаминофена. Однако тиолы в концентрациях, обычно применяемых для защиты клеток от окислительного стресса, могут оказывать и неожиданный повреждающий эффект (Munday, 1989; Held et al., 1996; Tartier et al., 2000; Qanungo et al., 2004). Это обусловлено их двойственной природой: в частности, способностью дитиотреитола (ДТТ) (Taatjes et al., 1997; Spear, Aust, 1998), N-ацетилцистеина (НАС) и глутатиона (GSH) (Held, Biaglow, 1994; Kwak et al., 1995; Held et al., 1996; Chan et al., 2001; Thibodeau et al., 2001; Sagrista et al., 2002; Borisenko et al., 2004; Farombi et al., 2004), цистеина (Yang et al., 2000), цистеамина и других низкомолекулярных тиолов (Jeitner et al., 1998) генерировать активные формы кислорода (АФК) в реакциях с ионами переходных металлов (Fe и Cu) или реагировать со свободными радикалами и самим становиться тиольными радикалами, что в итоге ведет к повреждению ДНК и других биомолекул (Long, Halliwell, 2001).

Недавно мы обнаружили цитотоксический эффект тиолов GSH или НАС при внесении их в культуру клеток одновременно с витамином В<sub>12b</sub> (Соловьева и др., 2005) и предположили, что в комбинации с Со<sup>3+</sup>, входящим в состав гидроксикобаламина, эти вещества, как и аскор-

биновая кислота (Akotov et al., 2000), способны выступать в качестве прооксидантов. Как подчеркивают некоторые авторы, в антиоксидантной терапии зачастую не учитывается сопутствующее поступление соединений прооксидантного действия, что может привести к понижению ее эффективности и даже к повреждающему воздействию на клетки и ткани организма (Бобырев и др., 1994). С другой стороны, цитотоксический эффект сочетаний тиола и В<sub>12b</sub> может быть взят за основу при разработке новых лекарственных (противоопухолевых) средств.

Целью настоящей работы являлось изучение механизма прооксидантного и цитотоксического действия тиолов НАС или GSH в сочетании с витамином В<sub>12b</sub>.

### Материал и методика

В работе использовали витамин В<sub>12b</sub> (Курганский комбинат медпрепаратов и изделий, Россия), среду ДМЕ, глутатион, НАС, каталазу, пируват, фенантролин (MPBiomedicals, США), эмбриональную телячью сыворотку (FBS) (HyClone, США), бисбензимидаз Н33342 и Н33258, этидиум бромид, неокупроин, дефероксамин мезилат и кристаллический фиолетовый (Sigma, США) и 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (Molecular probes, США).

Клетки карциномы гортани человека Нер-2, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур

(Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), выращивали в среде ДМЕ с добавлением 10 % FBS, 80 мкг/мл гентамицина, 2,2 г/л бикарбоната натрия при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Исследуемые вещества добавляли в среду через 24 ч после посева клеток (50 тыс. кл./мл). Неокупроин и фенантролин добавляли из маточных растворов в этаноле за 30 мин до введения в среду V<sub>12b</sub> и тиола; итоговая концентрация этанола в среде не превышала 0,1 %. Остальные вещества растворяли в среде ДМЕ. Хелатор железа DFO добавляли за 2 ч, каталазу и пируват — непосредственно перед внесением тиола и V<sub>12b</sub>.

Цитотоксическое действие веществ оценивали с помощью методики, основанной на окраске клеточных культур кристаллическим фиолетовым (Nomizu et al., 1995). Клетки высевали в 96-луночные микропланшеты и через 1 сут после посева добавляли тиол и витамин V<sub>12b</sub> или только тиол. После 48 ч культивирования оценивали количество прикрепленных клеток в лунках, используя окраску кристаллическим фиолетовым. О доле клеток, выражаемой в процентах от контрольных значений, судили по оптической плотности. В ряде экспериментов долю погибших клеток определяли после их открепления трипсином, с помощью окраски трипановым синим.

Аберрантное распределение хроматина выявляли методом люминесцентной микроскопии. Все клетки, включая открепившиеся, собирали и окрашивали одновременно двумя красителями — бисбензимином H33342, который связывается с ДНК живых и погибших клеток, и этидиум бромидом, связывающимся с ДНК погибших клеток, в конечной концентрации 1 мкг/мл каждый (Акатов и др., 2000). Использовали объектив 40× и светофильтры, при которых ядра погибших клеток люминесцировали оранжевым цветом, а ядра живых клеток — зеленым. К апоптотическим относили клетки с фрагментированными ядрами, с маргинальным распределением хроматина, а также мелкие клетки с однородным, интенсивно флуоресцирующим (конденсированным) хроматином (Cohen, 1993). Некротическими считали клетки с гетерогенным хроматином, характерным для неповрежденных клеток контрольных культур, но флуоресцирующим оранжевым цветом. В каждом препарате (300—500 клеток) подсчитывали количество погибших (некротических и апоптотических) и живых клеток (в том числе апоптотических).

Кроме того, наличие апоптотических клеток оценивали методом проточной цитометрии с помощью цитометра PARTECIII (Германия) по присутствию частиц в суб-G<sub>1</sub>-области на ДНК-цитограммах. Все клетки, включая открепившиеся, фиксировали 50%-ным раствором этанола в растворе Эрла, pH 7.2. ДНК клеток окрашивали красителем бисбензимином H33258 (5 мкг/мл).

Чтобы выявить межнуклеосомную фрагментацию, 1 мкг клеточной ДНК разделяли электрофоретически в 1,2%-ном агарозном геле согласно описанной процедуре (Ren et al., 2001). Гели окрашивали этидиум бромидом (0,5 мкг/мл) в течение 20 мин.

Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среде определяли полярографическим методом, поскольку методы, основанные на пероксидазной реакции с окислением красителя, в присутствии восстановителей непригодны (Акатов et al., 2000; Long, Halliwell, 2001). Через 1 сут после посева 350—400 тыс. клеток во флакон T25 добавляли тиол (NAC или GSH до конечной концентрации 5 мМ), в отдельности или в сочетании с 25 мМ V<sub>12b</sub>. Пробы среды

через определенные промежутки времени вносили в измерительную ячейку с O<sub>2</sub>-электродом. Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли по изменению содержания O<sub>2</sub> после добавления каталазы.

Внутриклеточную окислительную активность оценивали по флуоресценции зонда DCFHDA с помощью проточного цитометра PARTECIII. Клетки высевали в культуральные флаконы (50 тыс. кл./мл) за 1 сут до опыта. Выполняли эксперименты в двух вариантах (Pantopoulos et al., 1997).

1. Для оценки нарушения редокс-баланса клеток в результате сочетанного действия V<sub>12b</sub> и тиола оценивали окислительную активность эндогенного происхождения. Для этого клетки инкубировали с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или с V<sub>12b</sub> совместно с тиолом. Затем открепившиеся клетки осаждали центрифугированием, а прикрепленные открепляли раствором трипсина, объединяли их, окрашивали 40 мкМ DCFHDA в свежей ростовой среде в темноте при 37 °С в течение 30 мин, центрифугировали, осадок ресуспендировали в холодном PBS и регистрировали флуоресценцию клеток на проточном цитометре.

2. Внутриклеточную окислительную активность, обусловленную генерацией АФК внутри клетки и потоком внеклеточной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> внутрь клетки во время инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или с V<sub>12b</sub> совместно с тиолом, оценивали следующим образом. Клетки открепляли с помощью трипсина, суспендировали в ростовой среде, окрашивали DCFHDA, отмывали от внеклеточного красителя, ресуспендировали в ростовой среде, инкубировали с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или с V<sub>12b</sub> и тиолом совместно определенное время, ресуспендировали в холодном PBS и немедленно регистрировали флуоресценцию. Контролем служили клетки без добавления тиолов и витамина V<sub>12b</sub>.

Результаты обрабатывали статистически. По данным 3—5 опытов определяли среднее арифметическое значение и ошибку определения среднего ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ). Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты

Ни NAC, ни GSH в диапазоне концентраций 0,1—10,0 мМ в среде ДМЕ с сывороткой не оказывали цитотоксического действия на клетки (рис. 1, кривые 3, 4). Сочетания 5 или 10 мМ NAC с 25 мкМ витамина V<sub>12b</sub> оказывали выраженный цитотоксический эффект (рис. 1, кривая 1). Витамин V<sub>12b</sub> в диапазоне концентраций 0,3 мкМ—3,0 мМ был нетоксичен. Глутатион, который обычно добавляют в среду инкубации с целью ингибировать окислительный стресс, также был токсичен для клеток в сочетании с витамином V<sub>12b</sub> (рис. 1, кривая 2). Достоверной разницы в величине цитотоксического действия V<sub>12b</sub> и 5 мМ GSH или V<sub>12b</sub> и 5 мМ NAC не выявлено. Доля погибших клеток, окрашенных трипановым синим или этидиум бромидом, начинала увеличиваться через 4 ч после одновременного добавления V<sub>12b</sub> и тиола и достигала 90 % через 48 ч культивирования (рис. 2). Таким образом, сочетанное применение тиола и витамина V<sub>12b</sub> оказывает именно цитотоксический, но не цитостатический эффект. Прерывая сочетанное действие V<sub>12b</sub> и тиола путем замены инкубационной среды на свежую ростовую среду, мы установили, что инициация гибели основной части (90 %) клеток происходит в течение первых 2 ч инкубации. В этот период времени доля погибших клеток остается на уровне контроля (5 %).

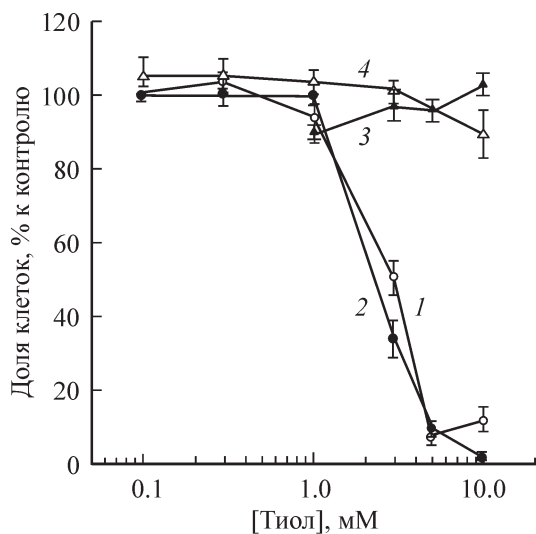


Рис. 1. Цитотоксическое действие NAC совместно с витамином  $V_{12b}$  (1) или GSH совместно с  $V_{12b}$  (2) на клетки HEp-2 в зависимости от концентрации тиола.

Кривая 3 — NAC, 4 — GSH. Тиол (5 мМ) и  $V_{12b}$  (25 мкМ) добавляли через 1 сут после посева клеток в микропланшет. Через 2 ч среду в лунках заменяли свежей ростовой средой. Цитотоксичность оценивали через 48 ч по окраске кристаллическим фиолетовым. Представлены данные 5 экспериментов.

При изучении типа гибели клеток, вызываемой сочетанным действием тиола и витамина  $V_{12b}$ , мы обнаружили увеличение доли клеток с уменьшенным объемом и фрагментированным, а также конденсированным хроматином, что является характерным морфологическим признаком апоптоза. Достоверное увеличение доли апоптотических клеток (рис. 2) отмечали уже после 4 ч действия тиола и витамина  $V_{12b}$ . Конденсированный и фрагментированный по апоптотическому типу хроматин был обнаружен как в погибших клетках, так и в клетках, сохраняющих целостность плазматической мембраны, т. е. еще живых. Доля клеток с конденсированным хроматином превышала долю клеток с фрагментированным хроматином, которая в опыте составляла обычно не более 20 % от общего числа клеток. Доля некротических клеток не превышала  $3.1 \pm 0.5$  %, в контроле она составляла  $1.5 \pm 0.1$  %. Методом проточной цитометрии было выявлено постепенное увеличение доли клеток в суб- $G_1$ -области при сочетанном действии  $V_{12b}$  и NAC или  $V_{12b}$  и GSH, что означает появление клеток с субдиплоидным набором ДНК вследствие потери части ДНК при апоптозе (рис. 3, б, в). Появление межнуклеосомной фрагментации ДНК, характерной для апоптоза, после 8–10 ч инкубации клеток в присутствии  $V_{12b}$  и NAC или  $V_{12b}$  и GSH показано на рис. 4 (дорожки 3–5).

Как известно, один из механизмов антиоксидантного действия тиолов NAC и GSH — прямой перехват АФК. Действительно, NAC или GSH в концентрации 5 мМ в 2–3 раза ускоряли элиминацию  $H_2O_2$ , добавленной в клеточную культуру (рис. 5, а, кривые 2, 3). Сами по себе эти тиолы практически не вызывали образования  $H_2O_2$  в ростовой среде: обнаружено менее 8 и не более 5 мкМ  $H_2O_2$  после 2-часового действия NAC и GSH соответственно (рис. 5, б, кривые 3, 4), что согласуется с отсутствием их токсичности. Напротив, NAC (5 мМ) в сочетании с 25 мкМ  $V_{12b}$  уже через 10 мин вызывал накопление  $H_2O_2$  в среде до 30 мкМ. В последующие 2 ч

наблюдения концентрация  $H_2O_2$  поддерживалась на уровне 25–35 мкМ. При инкубации клеток с 25 мкМ  $V_{12b}$  и 5 мМ GSH также наблюдали повышение концентрации  $H_2O_2$  в среде до 25–30 мкМ (рис. 5, б, кривые 1, 2). Достоверных различий между экспериментами с NAC и GSH (рис. 5, б, кривые 1, 2) не обнаружено. В контрольных культурах мы не обнаружили накопления  $H_2O_2$  в среде.

Нетиоловые антиоксиданты каталаза (200 ед./мл) и пируват (10 мМ) при внесении на 2 ч в культуральную среду вместе с  $V_{12b}$  и GSH (или NAC) полностью ингибировали их цитотоксическое действие (рис. 6, а). Это указывает на то, что окислительный стресс, обусловленный сочетанным действием  $V_{12b}$  и тиола, является причиной гибели клеток. Хелаторы железа — фенантролин, связывающий  $Fe^{2+}$  (50 мкМ), и DFO (0.3 мМ), более прочно связывающий  $Fe^{3+}$  (Halliwell, Gutteridge, 1986; Byrnes, 1996), также устраняли цитотоксический эффект сочета-

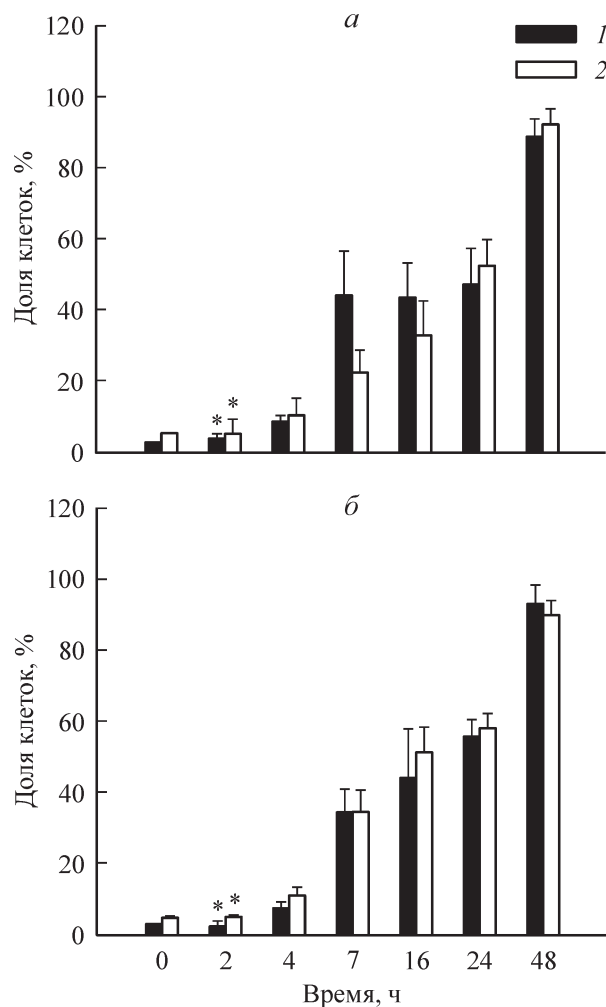


Рис. 2. Увеличение доли апоптотических (1) и погибших (2) клеток после сочетанного действия 25 мкМ  $V_{12b}$  с 5 мМ NAC (а) и 25 мкМ  $V_{12b}$  с 5 мМ GSH (б).

К апоптотическим относили погибшие клетки с aberrантным распределением хроматина и еще живые клетки, но с уже фрагментированным и конденсированным хроматином. Число погибших клеток определяли как сумму погибших апоптотических и некротических клеток. Контроль — необработанные клетки (0 ч). Звездочкой отмечены различия, недостоверные по отношению к контролю ( $P > 0.05$ ). Представлены данные 5 экспериментов.

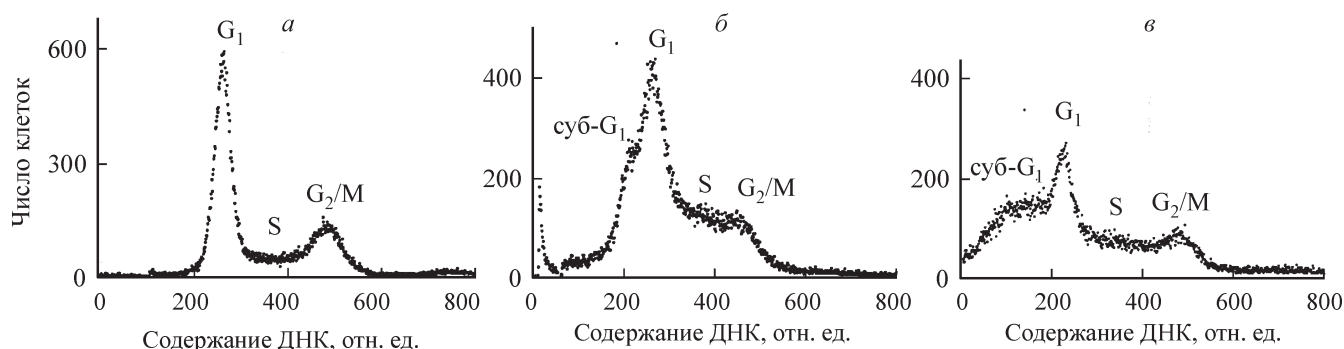


Рис. 3. Гистограммы распределения клеток Нер-2 по содержанию ДНК после сочетанного действия  $V_{12b}$  и тиола в течение 7 ч.  
*a* — контроль, *б* — 25 мкМ  $V_{12b}$  совместно с 5 мМ NAC, *в* — 25 мкМ  $V_{12b}$  совместно с 5 мМ GSH.

ния  $V_{12b}$  и тиола (рис. 6, *a*) и морфологические признаки апоптоза, снижая фрагментацию ядер и конденсацию хроматина в 6—8 раз, с 89 и 93 % (рис. 2, *a, б*) до 11—15 %. Защитный эффект DFO без преинкубации был в 1.5—2.0 раза менее выражен ( $P < 0.05$ ). Эффективность защитного действия фенантролина не зависела от преинкубации (данные не показаны). Накопление  $H_2O_2$  в среде, содержащей  $V_{12b}$  и тиол, в первые 2 ч наблюдения устранялось каталазой и пируватом, но не фенантролином и DFO (рис. 6, *б*). Хелатор меди неocupроин в концентрациях до 10 мкМ не устранял гибель клеток, а при повышении концентрации оказывал собственное цитотоксическое действие (данные не показаны).

Повышение внутриклеточной окислительной активности во время инициации гибели клеток при действии  $V_{12b}$  совместно с тиолом было обнаружено методом проточной цитометрии. В первые 30 мин сочетанного действия  $V_{12b}$  и тиола на клетки, предварительно окрашенные

флуоресцентным зондом DCFHDA, не обнаружено повышения их флуоресценции, хотя в среде был концентрационный пик  $H_2O_2$ . Через 1 ч регистрировали повышение флуоресценции клеток в 2.0—2.5 раза по сравнению с контролем (рис. 7, *a, б*), что указывает на внутриклеточный окислительный стресс. Этот стресс мог быть обусловлен внутриклеточной генерацией АФК и потоком в клетку перекиси водорода, образующейся вне клетки (рис. 5). Действие на клетки NAC или GSH в отсутствие  $V_{12b}$  (3—4 ч) приводило к падению их флуоресценции относительно контроля на 20—30 %. Эндогенная окислительная активность, которую оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных DCFHDA после их инкубации совместно с  $V_{12b}$  и тиолом (NAC или GSH) и удаления из среды этих веществ, через 1 ч не отличалась от контроля (рис. 8). Следовательно, редокс-система клеток в течение 1-го ч сочетанного действия  $V_{12b}$  и тиола оставалась неизменной и повышение внутриклеточной

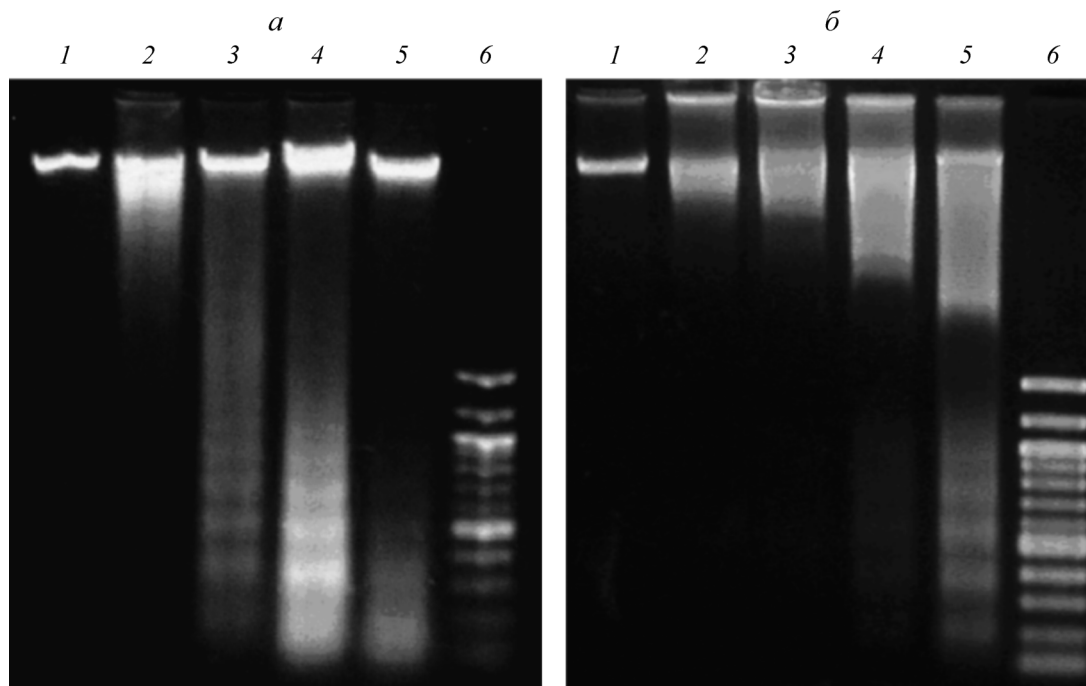


Рис. 4. Межнуклеосомная фрагментация ДНК клеток Нер-2, вызванная сочетанным действием 25 мкМ  $V_{12b}$  и 5 мМ тиола (NAC или GSH).

Дорожки: 1 — контроль; 2—5 — соответственно 7, 10, 12 и 16 ч сочетанного действия  $V_{12b}$  и 5 мМ NAC (*a*) или соответственно 6, 8, 10 и 12 ч сочетанного действия  $V_{12b}$  и 5 мМ GSH (*б*). Дорожка 6 — маркеры ДНК, кратные 100 парам оснований.

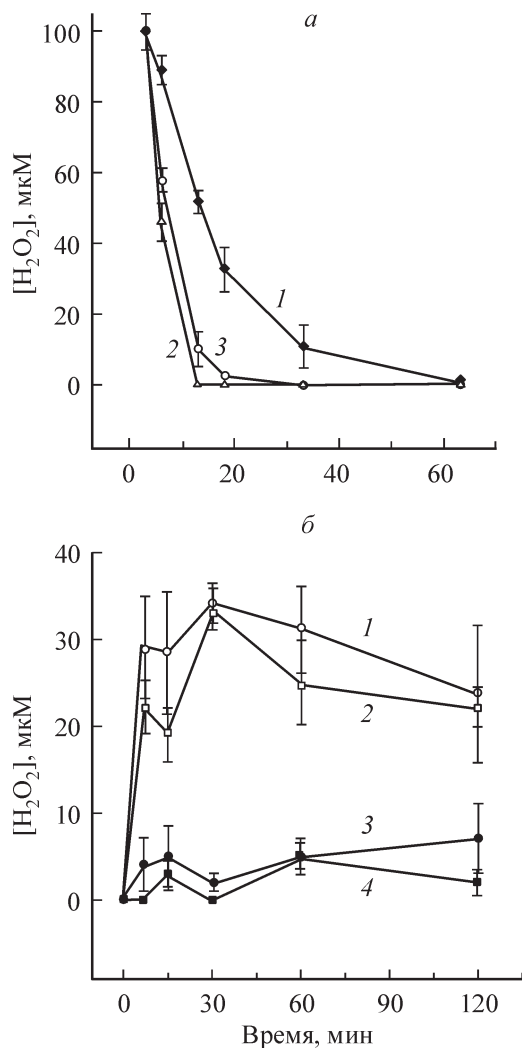


Рис. 5. Антиоксидантное действие тиолов по отношению к экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (а) и прооксидантное действие тиолов в сочетании с 25 мкМ V<sub>12b</sub> в культуре клеток (б).

а: кривая 1 — после введения 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в культуру клеток; кривые 2, 3 — после введения 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии 5 мМ NAC или 5 мМ GSH соответственно. б: кривые 1, 2 — кинетика накопления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ростовой среде после добавки V<sub>12b</sub> совместно с 5 мМ NAC или с 5 мМ GSH в культуру клеток соответственно; кривые 3, 4 — в присутствии 5 мМ NAC или GSH соответственно. Тиолы вносили через 1 сут после посева 3.5 · 10<sup>5</sup> клеток в культуральный флакон T25 непосредственно перед добавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или V<sub>12b</sub>. Представлены данные 3 экспериментов.

точной окислительной активности (рис. 7) было обусловлено экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 5). Совместное 2-часовое действие V<sub>12b</sub> и тиола приводит к значительному повышению продукции АФК эндогенного происхождения (рис. 8), которое свидетельствует о нарушении редокс-баланса клетки. Через 3—4 ч наблюдали появление клеток с интенсивностью флуоресценции, превышающей контрольную в 7—10 раз (рис. 8). Каталаза предотвращала внутриклеточный окислительный стресс, вызванный сочетанным действием V<sub>12b</sub> и тиола (данные не показаны). В качестве положительного контроля на рис. 8 показано увеличение флуоресценции клеток, инкубированных с 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 0.5 ч, до 20 раз по сравнению с контролем. Таким образом, повышение внутриклеточной окислительной активности во время инициации гибели клеток при совместном действии V<sub>12b</sub>

с GSH или с NAC обусловлено H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, образующейся в инкубационной среде, а на завершающей стадии инициации (2-й ч) — еще и нарушением редокс-баланса клеток.

## Обсуждение

В настоящее время достигнуто понимание того, что любой антиоксидант в силу своей двойственной природы в определенных условиях может выступать в качестве прооксиданта (Зенков и др., 2001; Kohen, Nyska, 2002). Так, аскорбиновая кислота в реакции с двухвалентным железом (Buettner, Jurkiewicz, 1996), с ионами других переходных металлов, например меди (Kimoto et al., 1983) и кобальта (Вольпин и др., 1998; Румянцева и др., 1989; Акатов и др., 2000), приводит к генерации АФК. В литературе имеются данные о том, что широко используемые в качестве антиоксидантов тиолы NAC и GSH могут также выступать в качестве прооксидантов, проду-

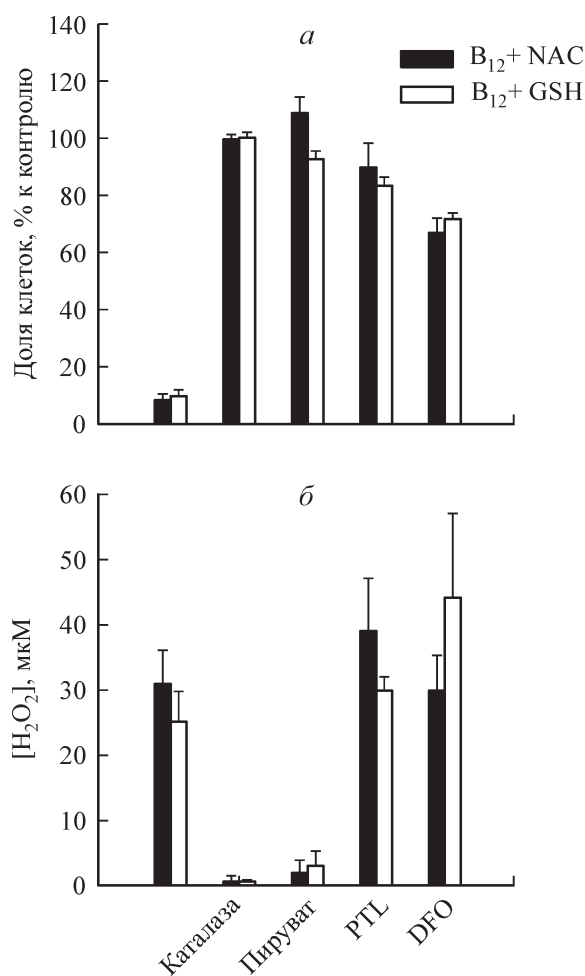


Рис. 6. Влияние нетиоловых антиоксидантов и хелаторов железа на цитотоксический эффект (а) и накопление перекиси водорода в среде (б) при совместном действии 5 мМ NAC или 5 мМ GSH с витамином V<sub>12b</sub> (25 мкМ).

а — антиоксиданты и хелаторы железа добавляли, как описано в разделе «Материал и методика»; сочетанное действие V<sub>12b</sub> и тиола прерывали через 2 ч путем замены инкубационной среды свежей ростовой средой; количество клеток через 48 ч определяли по окраске кристаллическим фиолетовым. б — концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среде оценивали с помощью O<sub>2</sub>-электрода через 1 ч после внесения в среду V<sub>12b</sub> совместно с NAC или GSH. Представлены данные 5 экспериментов.

цировать OH·-радикал и оказывать повреждающее действие на клетки при переходе в тиольные радикалы (Sagrista et al., 2002; Borisenko et al., 2004). В некоторых случаях цитотоксическое действие NAC, применяемого в качестве предшественника внутриклеточного глутатиона, заметно превышало эффект, достигаемый при инкубации с экзогенным GSH (Held, Biaglow, 1994; Thibodeau et al., 2001). Это объясняют меньшей способностью GS-радикала к образованию супероксида по сравнению с N-ацетилтильным радикалом и быстрым образованием GSSG (окисленного глутатиона) при реакции двух глутатионильных радикалов. Глутатион способен связывать ионы  $\text{Cu}^+$ , блокируя их реакцию с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , приводящую к образованию гидроксил-радикала. NAC в отличие от GSH, восстанавливая ионы  $\text{Cu}^{2+}$  в  $\text{Cu}^+$ , образует тиольный радикал, который реагирует с кислородом воздуха, образуя супероксид-анион (Thibodeau et al., 2001). В некоторых случаях наблюдалась токсичность глутатиона при его внесении в культуральную среду. Авторы объясняют этот эффект тем, что глутатион может восстанавливать ионы железа, необходимые для образования OH·-радикала, из перекиси водорода (Brazzolotto et al., 1999). Кроме того,  $\text{Fe}^{2+}$  в реакции с кислородом может образовывать перферрильные ионы, обладающие более выраженным повреждающим действием (Farombi et al., 2004). Некоторые авторы считают, что глутатионильные или радикалы, образующиеся из них далее по каскаду реакций, могут присутствовать в клетках в значительных количествах (Kwak et al., 1995). Таким образом, использование тиолов в качестве антиоксидантов может привести к неожиданным повреждающим эффектам. В настоящее время лекарственные препараты антиоксидантного действия на основе глутатиона и ацетилцистеина широко применяются, разрабатываются их новые модификации (Шанин и др., 2003). Антиоксидантная терапия часто дополняется введением витаминных смесей, компонентом которых может являться гидроксикобаламин — витамин  $\text{V}_{12\text{b}}$ . В некоторых странах введение витамина  $\text{V}_{12\text{b}}$  производят интраназально (Dharmarajan, Norkus, 2001). Этот же способ используется при лечении насморка с помощью препарата АЦЦ, основным компонентом которого является NAC. Поэтому изучение взаимодействия тиолов NAC и GSH с витамином  $\text{V}_{12\text{b}}$  необходимо с целью повышения эффективности применения этих веществ и предотвращения возможных нежелательных последствий их совместного использования.

Полученные нами результаты расширяют и детализируют представления о прооксидантном действии тиолов в сочетании с катализаторами на основе металлов с переменной валентностью. Нами установлена длительная генерация  $\text{H}_2\text{O}_2$  при внесении тиолов GSH или NAC в физиологических концентрациях совместно с  $\text{V}_{12\text{b}}$ , но не тиолами в отдельности. Уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среде достигает 30—40 мкМ.  $\text{H}_2\text{O}_2$  в этой концентрации оказывает на клетки HEp-2 незначительный цитотоксический эффект при внесении в среду однократно, но при внесении тиола совместно с  $\text{V}_{12\text{b}}$  поддержание такой концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  продолжается в течение как минимум 1.5—2.0 ч. Известно, что воздействие на клетку невысоких, но длительно поддерживаемых концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  по степени эффекта подобно однократной добавке  $\text{H}_2\text{O}_2$  в высокие концентрации (Pantopoulos et al., 1997). Очевидно, обнаруженное в наших экспериментах длительное поддержание концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в культуральной среде, содержащей  $\text{V}_{12\text{b}}$  и GSH или  $\text{V}_{12\text{b}}$  и NAC, на уровне 30 мкМ и выше можно рассматривать в качестве

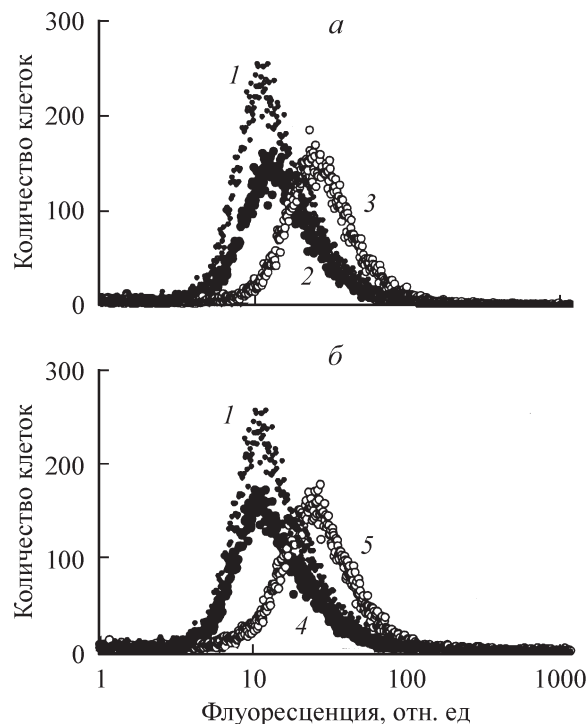


Рис. 7. Повышение внутриклеточной окислительной активности в клетках HEp-2 при 1-часовом действии  $\text{V}_{12\text{b}}$  совместно с NAC (а) или GSH (б), вызываемое потоком  $\text{H}_2\text{O}_2$  из среды и собственной генерацией АФК клеткой.

1 — контроль, 2 — NAC, 3 —  $\text{V}_{12\text{b}}$  совместно с NAC, 4 — GSH, 5 —  $\text{V}_{12\text{b}}$  совместно с GSH. Концентрация  $\text{V}_{12\text{b}}$  25 мкМ, NAC и GSH — по 5 мМ. Общее число клеток в каждой из цитограмм не менее 10 тыс. Приведены данные 1 из 3 экспериментов, давших одинаковый результат.

причины вызываемого ими цитотоксического эффекта. Это подтверждается тем, что нейтрализация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среде при помощи каталазы или пирувата ингибировала и цитотоксический эффект, наблюдаемый при сочетанном действии тиола и витамина  $\text{V}_{12\text{b}}$ . Отметим, что NAC и GSH во всех используемых нами концентрациях не оказывали цитотоксического действия и вызывали незначительное накопление  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среде, существенно меньшее, чем в работе Лонг и Халливелл (Long, Halliwell, 2001). Такое отличие может быть обусловлено, согласно нашим и литературным данным (Held et al., 1996), составом используемой сыворотки, в частности разным содержанием металлов переменной валентности, с которыми тиолы могут вступать в редокс-взаимодействие.

Согласно нашим результатам, развитие окислительного стресса в клетке при сочетанном действии тиола  $\text{V}_{12\text{b}}$  выглядит следующим образом. Сначала (на протяжении примерно 30 мин) окислительно-восстановительная система клеток справляется с потоком экзогенной  $\text{H}_2\text{O}_2$ , достигающим максимума уже в первые 10 мин. Однако затем, к концу 1-го ч, обнаруживается внутриклеточный окислительный стресс. Это указывает на снижение способности редокс-системы клеток сдерживать поток экзогенной  $\text{H}_2\text{O}_2$ , хотя, судя по уровню эндогенных АФК, близкому к контролю, она еще не повреждена. Снижение антиоксидантной активности в это время вряд ли связано с истощением глутатиона, поскольку известно, что падение концентрации внутриклеточного глутатиона под действием перекиси водорода начинается позднее (Kwak et al., 1995). Так, при сочетанном дейст-

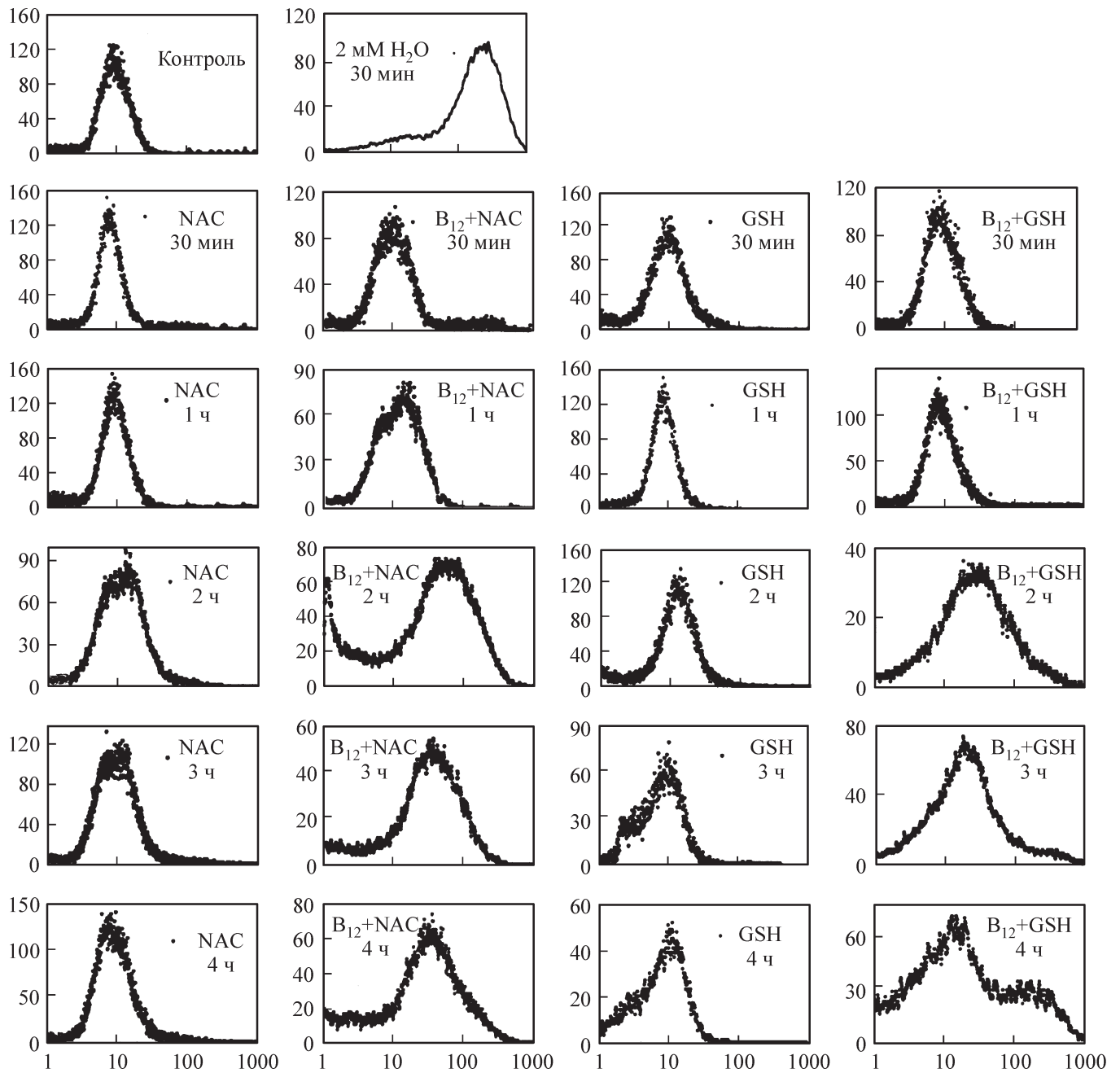


Рис. 8. Изменения внутриклеточной окислительной активности эндогенного происхождения после инкубации клеток HEP-2 с  $B_{12}$  и тиолом.

По горизонтали — флуоресценция, отн. ед.; по вертикали — количество клеток. Общее число клеток в каждой из цитогрaмм не менее 10 тыс. Окислительную активность оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных DCHFDA. Приведены данные 1 из 3 экспериментов, давших одинаковый результат.

вии витаминов  $B_{12b}$  и С снижение GSH в клетках HEP-2 начиналось через 3 ч после их внесения в среду, при этом развитие окислительного стресса, инициация и кинетика клеточной гибели были близкими к тем, которые описаны в настоящей статье (Акатов et al., 2000). Нарушение редокс-баланса клетки наблюдается к концу 2-го ч действия, что выражается в повышении уровня АФК эндогенного происхождения. Устранение катализатор этого эффекта наряду с клеточной гибелью доказывает, что внутриклеточный окислительный стресс является ключевой составляющей цитотоксического эффекта при инкубации клеток с тиолом и  $B_{12b}$ .

Опыты с хелаторами металлов показывают, что одного окислительного стресса для инициации апоптоза при сочетанном применении тиола с витамином  $B_{12b}$  недостаточно. Известно, что  $H_2O_2$  в клетке может реагировать с металлами переменной валентности ( $Fe^{2+}$  и  $Cu^+$ ), при этом «по месту» их локализации генерируется гидроксил-радикал, повреждающий биомолекулы (Halliwell, Gutteridge, 1986; Held, Biaglow, 1994; Yang et al., 2000; Barbouti et al., 2001; Thibodeau et al., 2001; Kohen, Nyska, 2002). Однако лишь дефероксамин и фенантролин, связывающие ионы железа на несколько порядков эффективнее, чем ионы меди, устраняли гено- и цитоток-

сический эффект, обусловленный сочетанным действием тиола и В<sub>12b</sub>, не влияя на накопление в среде Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Хелатор ионов меди неocupроин защитного действия не оказывал. Необходимость для устранения цитотоксического эффекта предварительной инкубации с DFO, который поступает в клетку путем эндоцитоза (Kotamraju et al., 2002), еще раз подчеркивает роль именно внутриклеточного железа. Отсутствие достоверной разницы между эффектами фенантролина, введенного за 1 ч или одновременно с В<sub>12b</sub> и тиолом, возможно, объясняется его более быстрым проникновением в клетку, а также большей эффективностью в связывании Fe<sup>2+</sup>, непосредственно реагирующего с Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (Vugnes, 1996). В целом полученные результаты указывают на необходимость участия внутриклеточного железа в инициации гибели клеток сочетанным действием тиола и В<sub>12b</sub>.

Таким образом, в нашей работе показано, что тиол-антиоксиданты (НАС или GSH) при сочетании применении с витамином В<sub>12b</sub> проявляют прооксидантные свойства. Экзогенный окислительный стресс, обусловленный реакцией тиола с В<sub>12b</sub>, вызывает внутриклеточный окислительный стресс, нарушение редокс-баланса и инициацию апоптотической гибели клеток при обязательном участии внутриклеточного железа. Полученные результаты указывают на важность правильного подбора антиоксидантов и представляют интерес для клеточной биологии, онкологии и фармакологии.

#### Список литературы

- Акатов В. С., Евтодиенко Ю. В., Медведев А. И., Лещенко В. В., Соловьева М. Е., Кудрявцев А. А., Лежнев Э. И., Якубовская Р. И. 2000. Повреждение ДНК и гибель опухолевых клеток в результате совместного действия витаминов В<sub>12b</sub> и С. Докл. РАН. 373 (6) : 838—840.
- Бобырев В. Н., Почерняева В. Ф., Стародубцев С. Г., Бобырева Л. Е., Дубинская Г. М., Воскресенская О. Н. 1994. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей — основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами. Эксперим. клин. фармакол. 57 (1) : 47—54.
- Вольгин М. Е., Крайнова Н. Ю., Левитин И. Я., Мутяева З. Я., Новодарова Г. Н., Оганезов В. К., Панкратов А. А., Чиссов В. И., Якубовская Р. И. 1998. Соединения ряда В<sub>12b</sub> в сочетании с аскорбиновой кислотой как потенциальные противоопухолевые агенты. Рос. хим. журн. 42 (5) : 116—127.
- Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. 2001. Окислительный стресс. М.: Наука. 342 с.
- Румянцева Г. В., Вайнер Л. М., Тувин М. Ю., Новодарова Г. Н., Вольгин М. Е. 1989. Генерация ОН-радикалов при окислительно-восстановительных реакциях корриновых комплексов кобальта. Изв. АН СССР. Сер. хим. 12 : 2679—2683.
- Соловьева М. Е., Соловьев В. В., Фасхутдинова А. А., Кудрявцев А. А., Акатов В. С., чл.-кор. РАН Чайлахян Л. М. 2005. Прооксидантное и цитотоксическое действие тиолов в сочетании с витамином В<sub>12b</sub>. Докл. РАН. 404 (5) : 704—706.
- Шанин Ю. Н., Шанин В. Ю., Зиновьев Е. В. 2003. Антиоксидантная терапия в клинической практике. СПб.: ЭЛБИ-СПб. 128 с.
- Akatov V. S., Evtodienko Y. V., Leshchenko V. V., Teplova V. V., Potselueva M. M., Kruglov A. G., Lezhnev E. I., Yakubovskaya R. I. 2000. Combined vitamins В<sub>12b</sub> and C induce the glutathione depletion and the death of epidermoid human larynx carcinoma cells HEP-2. Biosci. Rep. 20 : 411—417.
- Barbouti A., Doulias P., Zhu B., Frei B., Galaris D. 2001. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. Free Radic. Biol. Med. 31 : 490—498.
- Borisenko G. G., Martin I., Zhao Q., Amoscato A. A., Tyurina Y. Y., Kagan V. E. 2004. Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. Evidence for glutathionyl radical-induced peroxidation of phospholipids and cytotoxicity. J. Biol. Chem. 279 : 23 453—23 462.
- Brazzolotto X., Gaillard J., Pantopoulos K., Hentze M., Moulis J.-M. 1999. Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide *in vitro* but is not activated for iron-responsive element binding. J. Biol. Chem. 274 : 21 625—21 630.
- Buettner G. R., Jurkiewicz B. A. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. Radiat. Res. 145 : 532—541.
- Byrnes R. W. 1996. Evidence for involvement of multiple iron species in DNA single-strand scission by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HL-60 cells. Free Radic. Biol. Med. 20 : 399—406.
- Chan E. D., Riches D. W., White C. W. 2001. Redox paradox: effect of N-acetylcysteine and serum on oxidation reduction-sensitive mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 24 : 627—632.
- Cohen J. J. 1993. Apoptosis. Immunol. Today. 14 : 126—130.
- Dharmarajan T. S., Norkus E. P. 2001. Approaches to vitamin В<sub>12b</sub> deficiency. Early treatment may prevent devastating complications. Postgraduate Med. 110 : 99—105.
- Farombi E. O., Moller P., Dragsted L. O. 2004. Ex-vivo and *in vitro* protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. Cell Biol. Toxicol. 20 : 71—82.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and an iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246 : 501—514.
- Held K. D., Biaglow J. E. 1994. Mechanisms for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. Radiat. Res. 139 : 15—23.
- Held K. D., Sylvester F. C., Hopcia K. L., Biaglow J. E. 1996. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. Radiat. Res. 145 : 542—553.
- Jeitner T. M., Delikatny E. J., Bartier W. A., Capper H. R., Hunt N. H. 1998. Inhibition of drug-naive and -resistant leukemia cell proliferation by low molecular weight thiols. Biochem. Pharmacol. 55 : 793—802.
- Kimoto E., Tanaka H., Gytoku J., Morishige F., Pauling L. 1983. Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the copper: glycylglycylhistidine complex. Cancer Res. 43 : 824—828.
- Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation in biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol. Pathol. 30 : 620—650.
- Kotamraju S., Chitambar C. R., Kalivendi S. V., Joseph J., Kalyanaraman B. 2002. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells. J. Biol. Chem. 277 : 17 179—17 187.
- Kwak H. S., Yim H. S., Chock P. B., Yim M. B. 1995. Endogenous intracellular glutathionyl radicals are generated in neuroblastoma cells under hydrogen peroxide oxidative stress. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 4582—4586.
- Long L. H., Halliwell B. 2001. Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286 : 991—994.
- Munday R. 1989. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. Free Radic. Biol. Med. 7 : 659—673.
- Nomizu M., Kim W. H., Yamamura K., Utani A., Song S., Otake A., Roller P. P., Kleinman H. K., Yamada Y. 1995. Identification of cell binding sites in the laminin a1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. J. Biol. Chem. 270 : 20 583—20 590.
- Pantopoulos K., Mueller S., Atzberger A., Ansorge W., Stremmel W., Hentze M. W. 1997. Differences in regulation of iron regulatory protein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress. J. Biol. Chem. 272 : 9802—9808.
- Qanungo S., Wang M., Nieminen A.-L. 2004. N-acetyl-L-cysteine enhances apoptosis through inhibition of nuclear factor-κB in



hypoxic murine embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279 : 50 455—50 464.

Ren J.-G., Xia H.-L., Just T., Dai Y.-R. 2001. Hydroxyl radical-induced apoptosis in human tumor cells is associated with telomere shortening but not telomerase inhibition and caspase activation. *FEBS Lett.* 488 : 123—132.

Sagrsta M. L., Garcia A. E., Africa De Madariaga M., Mora M. 2002. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 36 : 329—340.

Spear N., Aust S. D. 1998. The effects of different buffers on the oxidation of DNA by thiols and ferric iron. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12 : 125—132.

Taatjes D. J., Gaudiano G., Koch T. H. 1997. Production of formaldehyde and DNA-adriamycin of DNA-daunomycin adducts, initiated through redox chemistry of dithiothreitol/iron, xanthine

oxidase/NADH/iron, or glutathione/iron. *Chem. Res. Toxicol.* 10 : 953—961.

Tartier L., McCarey Y. L., Biaglow J. E., Kochevar I. E., Held K. D. 2000. Apoptosis induced by dithiothreitol in HL-60 cells shows early activation of caspase 3 and is independent of mitochondria. *Cell Death Differ.* 7 : 1002—1010.

Thibodeau P. A., Kocsis-Bedard S., Courteau J., Niyonsenga T., Paquette B. 2001. Thiols can either enhance or suppress DNA damage induction by catecholestrogens. *Free Radic. Biol. Med.* 30 : 62—73.

Yang E. Y., Campbell A., Bondy S. C. 2000. Configuration of thiols dictates their ability to promote iron-induced reactive oxygen species generation. *Redox. Rep.* 5 : 371—375.

Поступила 22 III 2006

#### PROOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTION OF N-ACETYLCYSTEINE AND GLUTATHIONE COMBINED WITH VITAMIN B<sub>12b</sub>

M. E. Solovieva, V. V. Soloviev, A. A. Faskhutdinova, A. A. Kudryavtsev, V. S. Akatov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region;  
e-mail: groupakatov@rambler.ru

We studied the prooxidant and cytotoxic action of thiols N-acetylcystein (NAC) and glutathione (GSH) combined with vitamin B<sub>12b</sub>. The synergism of action of the thiols and B<sub>12b</sub> resulted in human carcinoma cell damage was found. It was shown that GSH and NAC in physiological doses combined with B<sub>12b</sub> caused the initiation of apoptosis. It was established that prooxidant action of the thiols combined with vitamin B<sub>12b</sub>, i. e. generation and accumulation of hydrogen peroxide in culture medium, led to intracellular oxidative stress and injury of cell redox system. These effects were completely abolished by nonthiol antioxidants catalase and pyruvate. The chelators of iron phenanthroline and deferoxamine did not suppress the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in culture medium but significantly inhibited the cell death induced by the thiols combined with B<sub>12b</sub>. Therefore, the thiols GSH and NAC widely used as antioxidants, in combination with vitamin B<sub>12b</sub> show prooxidant characteristics and induce, with the participation of intracellular iron, apoptotic HEp-2 cell death.

Key words: thiols, antioxidants, vitamin B<sub>12b</sub>, oxidative stress, apoptosis, tumor cells.