

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

© О. Г. Люблинская, К. М. Кирпичникова, И. А. Гамалей¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

¹ *электронный адрес: igamaley@mail.ru.cytspb.rssi.ru*

С помощью флуоресцентного зонда карбокси- H_2DCFDA , чувствительного к активным формам кислорода (АФК), изучали изменение уровня АФК в нормальных (3Т3) и трансформированных (3Т3-SV40) мышинных фибробластах при кратковременном (15 мин) действии антиоксидантов. Показали, что N-ацетилцистеин (НАС) уменьшает уровень АФК в обоих клеточных типах. Другой антиоксидант — альфа-липовая кислота (ALA) и ее восстановленная форма — дигидролиповая кислота (DHЛА) в концентрационном диапазоне 0.1—1.25 мМ оказывают прооксидантное действие, т. е. дозозависимо увеличивают уровень АФК в клетках. С привлечением данных из литературы обсуждается способность ALA и DHЛА активировать образование пероксида водорода.

Ключевые слова: активные формы кислорода, N-ацетилцистеин, альфа-липовая кислота, дигидролиповая кислота, прооксидантное действие.

Под антиоксидантами в живой системе подразумевают молекулы, которые способны замедлять или предотвращать окисление других молекул прежде всего активными формами кислорода (АФК), азота и их производными. Свободнорадикальная теория старения (Harman, 1956, 2009) и возникшая затем теория, согласно которой окислительный стресс лежит в основе патогенеза различных заболеваний (нейродегенеративных, атеросклероза, сахарного диабета и др.) (Witztum, Steinberg, 1991; Rochette et al., 2013), многие годы способствовала развитию взгляда на антиоксиданты как на средства против болезней, провоцируемых окислительным стрессом. При этом считалось, что антиоксиданты нейтрализуют радикалы и защищают клетку и организм от избытка АФК (окислительного стресса), продлевая жизнь многих молекул, в первую очередь ДНК (Birben et al., 2012). Многочисленные (но не все) эксперименты *in vitro* действительно подтверждают этот тезис. Что же касается работ *in vivo*, посвященных клиническому испытанию различных антиоксидантов, то к настоящему времени накопилось много данных об их негативном действии на пациентов и здоровых людей (см. обзоры: Howes, 2006; Watson, 2013). Однако механизм действия антиоксидантов и их специфичность, как правило, остаются невыясненными. Более того, не всегда ясно, уменьшает ли антиоксидант уровень АФК в клетке.

N-ацетилцистеин (НАС) и альфа-липовая кислота (ALA) хорошо известны не только как антиоксиданты, но и как фармакологические агенты. НАС благодаря наличию в молекуле свободной сульфгидрильной группы уничтожает различные радикалы и расщепляет дисульфидные связи (Aguoma et al., 1989; Parcell, 2002; Atmаса,

2004). Природный антиоксидант ALA в отличие от НАС не содержит восстановленных SH-групп до проникновения в клетку (является дисульфидным соединением). В клетке ALA восстанавливает SH-группы с помощью NAD(P)H-зависимых редуктаз (Packer, Cadenas, 2011), образуя сульфгидрильную форму — дигидролиповую кислоту (DHЛА), и действует как прямой антиоксидант внутри клетки. ALA — это уникальный антиоксидант, поскольку осуществляет защитные функции и в восстановленной, и в окисленной формах (Packer et al., 1995; Whiteman et al., 1996).

Задача настоящего исследования — выяснить, как меняется уровень АФК в нормальных и трансформированных фибробластах при действии антиоксидантов НАС, ALA и DHЛА в широком диапазоне концентраций.

Материал и методика

Объектами исследования были эмбриональные мышинные фибробласты линии Balb/3Т3 (клетки 3Т3) и такие же фибробласты, трансформированные вирусом SV40 (клетки 3Т3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, до образования неплотного монослоя. Антиоксиданты (Sigma, США) вводили в среду культивирования клеток до необходимой конечной концентрации (0.1—10 мМ) на короткое (15 мин) или длительное (24 ч) время. Маточные растворы антиоксидантов НАС, ALA и

DHLA (Sigma, США) готовили непосредственно перед экспериментом, при этом величину pH доводили до 7.0. NAC использовали в концентрациях 5 и 10 мМ, ALA и DHLA — 1.25, 0.7 и 0.1 мМ

Внутриклеточный уровень АФК оценивали методом проточной цитометрии, измеряя среднюю интенсивность флуоресценции зонда, чувствительного к окислению, преимущественно пероксидом водорода — 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (H₂DCFDA, Invitrogen, D-399, США) или его карбоксилированной модификации 6-карбокситетракарбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (carboxy-H₂DCFDA, Invitrogen, C-400, США). Для приготовления маточного раствора с концентрацией 10 мМ краситель растворяли в DMSO и хранили при -20 °С не более 1 мес. Непосредственно перед экспериментом готовили рабочий раствор красителя в фосфатно-солевом буферном растворе с конечной концентрацией 5 (H₂DCFDA) или 10 (carboxy-H₂DCFDA) мМ. Контрольные или предобработанные антиоксидантами клетки инкубировали в присутствии красителя в фосфатно-солевом буферном растворе 30 мин в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С в темноте. Затем клетки отмывали от красителя, переводили в суспензионное состояние с помощью раствора трипсина и анализировали на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для оценки влияния антиоксидантов на уровень АФК по изменению интенсивности флуоресценции (*I*) зонда использовали относительные значения:

$$I_{\text{отн.}} = (I^* - I_0)/(I - I_0),$$

где *I** — усредненная интенсивность флуоресценции клеток, предобработанных антиоксидантами, *I* — усредненная интенсивность флуоресценции контрольных клеток, *I*₀ — усредненная интенсивность клеточной автофлуоресценции. Результаты, полученные при использовании разных модификаций красителя, ни качественно, ни количественно не различались, поэтому в большинстве экспериментов мы использовали карбоксилированную форму зонда, дольше удерживаемую клеткой после отмывки красителя.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. При этом значимыми считали различия с 5%-ным уровнем значимости. Все измерения проводили не меньше чем в двух повторностях, эксперименты повторяли 3—5 раз.

Результаты

Для изучения влияния антиоксидантов NAC, ALA и DHLA на эндогенные уровни АФК в нормальных (3Т3) и трансформированных (3Т3-SV40) фибробластах клетки, обработанные антиоксидантами, инкубировали с редокс-чувствительным красителем и сравнивали интенсивность флуоресценции (ИФ) зонда в исследуемых и контрольных клетках. Цитофлуориметрический анализ показал, что обработка антиоксидантами приводила к изменению интенсивности свечения зонда в клетках по сравнению с контрольными. На рис. 1 как пример представлен результат одного из экспериментов — гистограмма, отображающая флуоресценцию трансформированных фибробластов, предобработанных NAC или ALA в течение 15 мин и окрашенных затем АФК-чувствительным красителем. Как показывает рисунок, действие

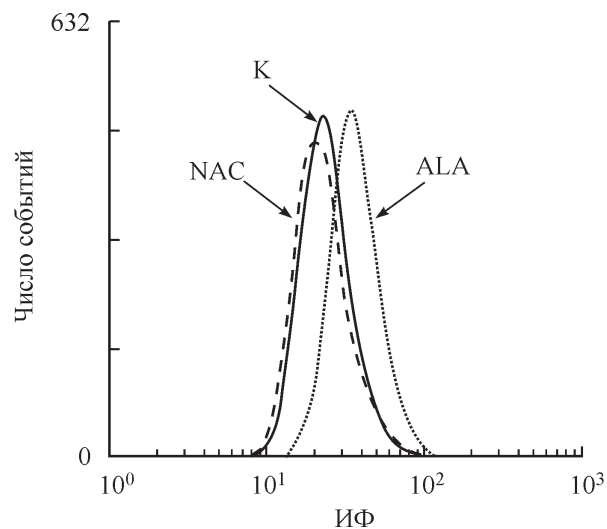


Рис. 1. Гистограмма, отражающая интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-чувствительного зонда (carboxy-H₂DCFDA) в клетках 3Т3-SV40 в контроле (К) и после 15-минутного действия антиоксидантов NAC (10 мМ) или ALA (1.25 мМ).

10 мМ NAC понижает ИФ зонда в исследуемых клетках, в то время как действие ALA (1.25 мМ) такой же длительности двукратно повышает ИФ зонда по сравнению с ИФ контрольных клеток. Нормальные фибробласты 3Т3 реагируют на действие NAC и ALA аналогичным образом. Заметим, что во всех экспериментах и те, и другие клетки полностью сохраняли жизнеспособность.

На рис. 2 представлены результаты серии измерений ИФ (*I*_{отн.}) АФК-зависимого зонда в фибробластах 3Т3 и 3Т3-SV40 после обработки антиоксидантами. ИФ редокс-зависимого зонда в клетках, предобработанных антиоксидантами, нормировали на ИФ зонда в контрольных клетках в соответствии с формулой (см. раздел «Материал и методика»). Из рисунка видно, что NAC понижает уровень АФК фибробластов, а ALA приводит к его повышению. Замена ALA на ее восстановленную модификацию DHLA в той же концентрации (1.25 мМ) не приводит к изменению характера ответа клеток (рис. 2). Полученные результаты говорят о том, что используемые в нашей работе антиоксиданты оказывают разнонаправленное влияние на эндогенный уровень АФК фибробластов: NAC снижает уровень АФК, в то время как ALA и DHLA повышают его, т. е. оказывают прооксидантное действие на клетки.

Поскольку прооксидантное действие антиоксиданта может зависеть от его концентрации, мы исследовали ИФ зонда в клетках, обработанных ALA и DHLA в широком диапазоне концентраций. Концентрацию уменьшали до 0.1 мМ. Результаты показаны на рис. 3. Из рисунка видно, что действие на клетки ALA в концентрационном диапазоне 0.1—0.7 мМ имеет дозозависимый характер, однако направление изменений остается прежним — ИФ зонда, отражающая уровень АФК, повышается. То же относится и к DHLA (не показано). Дальнейшее уменьшение концентрации ALA и DHLA уже не влияло на ИФ зонда и в тех, и в других клетках. В противоположность ALA, NAC оказывал антиоксидантное действие во всем исследованном диапазоне концентраций — от 5 до 10 мМ (см. таблицу).

В некоторых сериях экспериментов ИФ зонда измеряли через 30 мин и через 20—24 ч после введения антиоксиданта в среду с клетками. Результаты, полученные

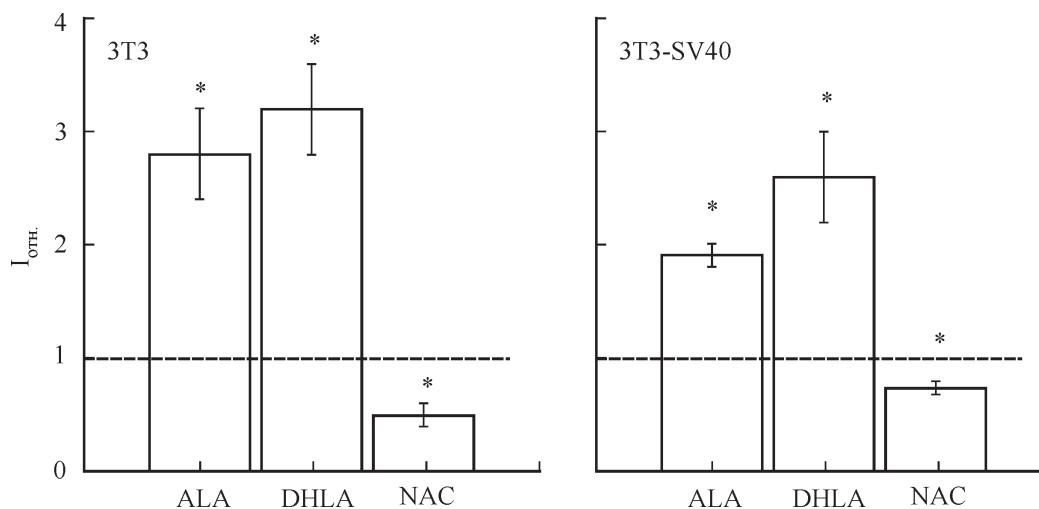


Рис. 2. Относительные изменения ИФ АФК-чувствительного зонда ($I_{\text{отн.}}$) в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 после 15-минутного действия ALA (1.25 мМ), DHLA (1.25 мМ) и NAC (10 мМ).

Здесь и на рис. 3: значение 1 (штриховая линия) соответствует уровню ИФ в контрольных клетках; звездочкой показана достоверность отличия от контрольного значения при $P \leq 0.05$. Вычисление $I_{\text{отн.}}$ — см. раздел «Материал и методика».

через 30 мин, не отличаются от данных для 15-минутного действия антиоксидантов. Через 24 ч уровень АФК в присутствии NAC продолжает сохраняться на том же низком уровне (не демонстрируется), а уровень АФК в присутствии ALA понижается до контрольного (см. таблицу). Эти данные говорят о том, что прооксидантное действие ALA со временем исчезает.

Обсуждение

Итак, полученные результаты свидетельствуют об антиоксидантном действии NAC и прооксидантном действии ALA и DHLA на нормальные и трансформированные фибробласты. Причем прооксидантное действие регистрируется через 15 мин после введения агента в среду с клетками, но со временем исчезает (20—24 ч). Данные о способности NAC понижать уровень АФК в клетках, про-

демонстрированные в настоящей статье, подтверждают давно известные аналогичные факты, полученные разными авторами, в том числе и нами (Гамалей и др., 2003; Gamaley et al., 2006). Во-первых, NAC, проникая в клетки, включается в синтез глутатиона — ключевой антиоксидантной молекулы (Sochman, 2002), увеличивая его содержание в клетке (Gamaley et al., 2006), а во-вторых, и сам может восстанавливать окисленный субстрат (окисленные SH-группы) и препятствовать образованию дисульфидных связей (Parasassi et al., 2010).

Гораздо сложнее обстоят дела с ALA и ее восстановленной формой DHLA. Эти два соединения были объявлены новыми антиоксидантами более 20 лет назад (Suzuki et al., 1991), однако до сих пор данные литературы пестрят противоречиями относительно и механизма, и результата их действия.

В организме человека естественным путем вырабатывается только один изомер — R-альфа-липоевая кислота.

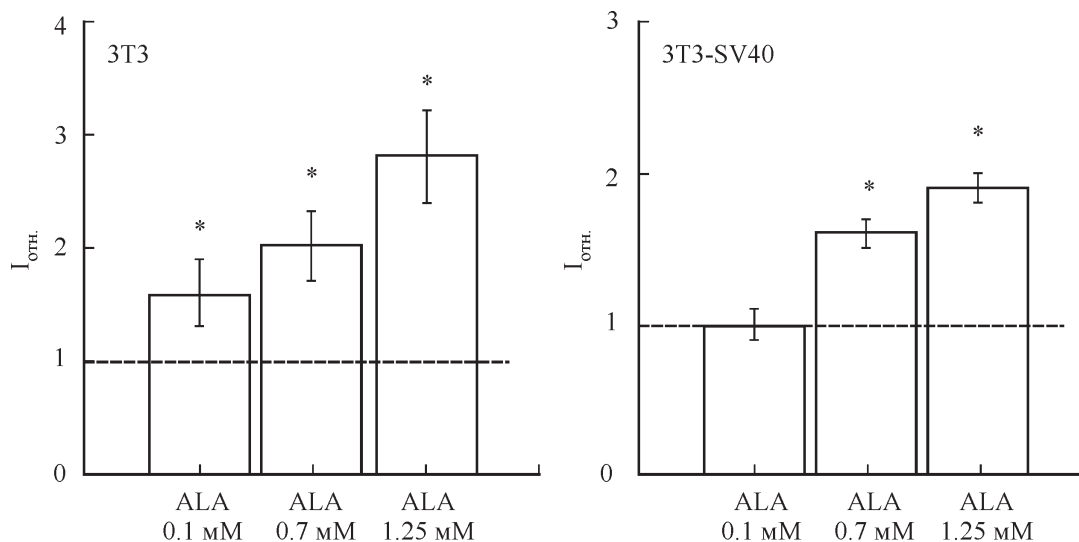


Рис. 3. Влияние ALA в разной концентрации (0.1—1.25 мМ, 15 мин) на ИФ АФК-чувствительного зонда в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40.

Влияние антиоксидантов на эндогенный уровень АФК фибробластов мыши

Антиоксидант	Концентрация, мМ	$I_{\text{отн.}}$
Фибробласты 3Т3		
ALA	0.10	1.6 ± 0.4
	0.70	2.0 ± 0.4
	1.25	2.8 ± 0.3
		0.9 ± 0.2 (через 24 ч)
DHLA	0.10	1.0 ± 0.2
	1.25	3.2 ± 0.4
NAC	5.00	0.6 ± 0.1
	10.00	0.5 ± 0.1
Трансформированные фибробласты 3Т3-SV40		
ALA	0.10	1.0 ± 0.1
	0.70	1.6 ± 0.1
	1.25	1.9 ± 0.1
DHLA	0.10	1.0 ± 0.2
	1.25	2.6 ± 0.4
NAC	10.00	0.72 ± 0.06

Примечание. $I_{\text{отн.}}$ — интенсивность флуоресценции АФК-зависимого зонда (карбоху- H_2DCFDA) относительно контрольного уровня, принятого за 1 (см. раздел «Материал и методика»). Время действия антиоксиданта во всех случаях, кроме выделенного жирным шрифтом, — 15 мин.

Все обсуждаемые полезные качества ALA относятся именно к этой форме. Химически полученная ALA является рацемической смесью (смесью в равных частях двух зеркальных изомеров) R- и плохо усвояемого S-изомера (Ikuta et al., 2013).

Общие антиоксидантные свойства ALA и DHLA, широко обсуждаемые в литературе, выражаются в их способности хелатировать металлы, ингибируя таким образом реакцию Фентона и продукцию гидроксильного радикала, ликвидировать гипохлорную кислоту и синглетный кислород; DHLA как более мощный антиоксидант в отличие от ALA может восстанавливать супероксидный анион-радикал, регенерировать эндогенные антиоксиданты (витамины С, Е и глутатион) и восстанавливать окислительные повреждения (Suzuki et al., 1991; см. обзоры: Biewenga et al., 1997; Ghibu et al., 2009). Таким образом, ALA и DHLA в химических экспериментах более активны против радикалов, чем против стабильной молекулы пероксида водорода (H_2O_2), с чем, очевидно, может быть связана плейотропность их действия на клетку. Благодаря перечисленным свойствам ALA привлекает внимание как агент для борьбы с окислительными повреждениями. Тем не менее влияние ALA и DHLA на внутриклеточный уровень АФК неоднозначно. Полученные нами данные об увеличении уровня АФК, главным образом H_2O_2 , в клетках при действии ALA и DHLA подтверждаются и объясняются рядом данных из литературы.

Анализ данных показывает, что в зависимости от условий эксперимента (*in vivo* или *in vitro*), природы окислительного стресса, концентрации и от клеточного типа (или органа) ALA может вызывать следующие эффекты (см. обзоры: Biewenga et al., 1997; Ghibu et al., 2009): 1) увеличивать уровень АФК в клетке; 2) умень-

шать уровень АФК в клетке и защищать клетку от окислительных повреждений; 3) приводить к повреждениям клетки, которые сопровождаются увеличением уровня проапоптотических и уменьшением содержания антиапоптотических белков, усилением активности каспаз и в итоге — клеточной гибелью. Первопричиной гибели клеток рассматривается и повышение уровня АФК при действии ALA (см., например: Kim et al., 2012), и понижение (Shi et al., 2008; Dozio et al., 2010). И оба факта авторы предлагают использовать в борьбе с опухолевыми клетками. Важно отметить, что результат действия ALA (по данным разных авторов) зависит от времени ее действия. Яркие выраженные положительные эффекты (защитное антиоксидантное действие), как правило, требуют длительного времени (многих часов). С этим фактом согласуется наш результат о временном прооксидантном действии ALA. Отметим, что концентрации ALA, используемые в экспериментах *in vitro* разными авторами, лежат в пределах 0.2 мкМ—2 мМ.

Интересно, что прооксидантное действие ALA в ряде работ обсуждается как необходимый шаг в сигнальной цепи, приводящий в итоге к антиоксидантной защите. Это связано с тем, что действие ALA может активировать NADPH-оксидазу и усиливать образование супероксидного анион-радикала (Al-Rashed et al., 2013), вызывать экспрессию гемоксигеназы 1, что способствует транлокации фактора Nrf2 из цитозоля в ядро, в результате чего экспрессируются гены антиоксидантных ферментов (Al-Rashed et al., 2013). АФК, производимые при действии ALA, модифицируют белок Keap 1, который удерживает Nrf2 в ядре (Koriyama et al., 2013). События могут осуществляться через активацию киназы Akt (PI3-киназный путь) (Koriyama et al., 2013) или киназ ERK1,2 (Cheng et al., 2006; Yao et al., 2012; Deng et al., 2013).

Данных по действию на клетки DHLA в литературе гораздо меньше, но в целом они аналогичны данным для ALA. Механизм действия в целом остается невыясненным, но убедительно показано, что DHLA способна защищать клетки от окислительного стресса (Wang et al., 2008), с одной стороны, а с другой — увеличивать внутриклеточный уровень АФК. Считается, что DHLA в отличие от ALA восстанавливает супероксидный анион-радикал до H_2O_2 , увеличивая, таким образом, концентрацию H_2O_2 (Suzuki et al., 1991). Кроме того, прооксидантное действие DHLA может объясняться ее способностью восстанавливать железо и образовывать серосодержащий радикал (Scott et al., 1994).

ALA применяется в клинике как фармакологический агент. Ее действие вызывает большой интерес именно как антиоксиданта, особенно при лечении заболеваний обмена веществ, таких как диабет. Однако учитывая полученные нами данные и аналогичные данные из литературы, нельзя не согласиться с существующим мнением о том, что вопрос о пользе и опасности применения ALA, имеющей явное двойственное действие, окончательно не решен (Cakatay, 2006).

Авторы благодарны Е. А. Вахромовой за помощь в постановке экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00935) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3T3 и 3T3SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.
- Al-Rasheed N. M., Attia H. A., Hasan I. H., Al-Amin M., Al-Ajmi H., Mohamad R. A. 2013. Adverse cardiac responses to alpha-lipoic acid in a rat-diabetic model: possible mechanisms? J. Physiol. Biochem. [Epub ahead of print].
- Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B. M., Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Rad. Biol. Med. 6 : 593—597.
- Atmaca G. 2004. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Med. J. 45 : 776—788.
- Biewenga G. P., Haenen G. R., Bast A. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen. Pharmacol. 29 : 315—331.
- Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant. World Allergy Organ. J. 5 : 9—19.
- Cakatay U. 2006. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Med. Hypotheses. 66 : 110—117.
- Cheng P. Y., Lee Y. M., Shih N. L., Chen Y. C., Yen M. H. 2006. Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. Free Rad. Biol. Med. 40 : 1313—1322.
- Deng C., Sun Z., Tong G., Yi W., Ma L., Zhao B., Cheng L., Zhang J., Cao F., Yi D. 2013. α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. PLoS ONE. 8 : e58371.
- Dozio E., Ruscica M., Passafaro L., Dogliotti G., Steffani L., Marthyn P., Pagani A., Demartini G., Esposti D., Fraschini F., Magni P. 2010. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27(Kip1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Eur. J. Pharmacol. 641 : 29—34.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik Y., Polozov Yu., Khaitlina S. 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biol. Int. 30 : 319—325.
- Ghibu S., Richard C., Vergely C., Zeller M., Cottin Y., Rochette L. 2009. Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. J. Cardiovasc. Pharmacol. 54 : 391—398.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. 11 : 298—300.
- Harman D. 2009. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954—2009. Biogerontology. 10 : 773—781.
- Howes R. M. 2006. The free radical fantasy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1067 : 22—26.
- Ikuta N., Sugiyama H., Shimosegawa H., Nakane R., Ishida Y., Uekaji Y., Nakata D., Pallauf K., Rimbach G., Terao K., Matsugo S. 2013. Analysis of the enhanced stability of r(+)-alpha lipoic acid by the complex formation with cyclodextrins. Int. J. Mol. Sci. 14 : 3639—3655.
- Kim J. I., Cho S. R., Lee C. M., Park E. S., Kim K. N., Kim H. C., Lee H. Y. 2012. Induction of er stress-mediated apoptosis by α -lipoic acid in A549 cell lines. Korean J. Thorac. Cardiovasc. 45 : 1—10.
- Koriyama Y., Nakayama Y., Matsugo S., Kato S. 2013. Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2—dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline. 1499 : 145—157.
- Packer L., Cadenas E. 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. J. Clin. Biochem. Nutr. 48 : 26—32.
- Parasassi T., Brunelli R., Costa G., De Spirito M., Krasnowski E. K., Lundeberg T., Pittaluga E., Ursini F. 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-Acetylcysteine. Sci. World J. 10 : 1192—1202.
- Parcell S. 2002. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Altern. Med. Rev. 7 : 22—44.
- Rochette L., Ghibu S., Richard C., Zeller M., Cottin Y., Vergely C. 2013. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. Mol. Nutr. Food Res. 57 : 114—125. doi: 10.1002/mnfr.201200608.
- Scott B. C., Aruoma O. I., Evans P. J., O'Neill C., Va der Vliet A., Cross C. E., Tritschler H., Halliwell B. 1994. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. Free Radic. Res. 20 : 119—133.
- Shi D. Y., Liu H. L., Stern J. S., Yu P. Z., Liu S. L. 2008. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway. FEBS Lett. 582 : 1667—1671.
- Sochman J. 2002. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?! J. Amer. Coll. Cardiol. 39 : 1422—1428.
- Suzuki Y. J., Tsuchiya M., Packer L. 1991. Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. Free Radic. Res. Commun. 15 : 255—263.
- Wang Y. J., Yang M. C., Pa M. H. 2008. Dihydrolipoic acid inhibits tetrachloroquinone-induced tumor promotion through prevention of oxidative damage. Food Chem. Toxicol. 46 : 3739—3748.
- Watson J. 2013. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. Open Biol. 3 : 120144. doi: 10.1098/rsob.120144.
- Whiteman M., Tritschler H., Halliwell B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and α 1-antitrypsin inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. FEBS Lett. 379 : 74—76.
- Witztum J. L., Steinberg D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J. Clin. Invest. 88 : 1785—1792.
- Yao Y., Li R., Ma Y., Wang X., Li C., Zhang X., Ma R., Ding Z., Liu L. 2012. α -Lipoic acid increases tolerance of cardiomyoblasts to glucose/glucose oxidase-induced injury via ROS-dependent ERK1/2 activation. Biochim. biophys. acta. 1823 : 920—929.

Поступила 17 VI 2013

COMPARATIVE ANTIOXIDANT ACTION ON THE LEVEL OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN NORMAL AND TRANSFORMED FIBROBLASTS

O. G. Lyublinskaya, K. M. Kirpichnikova, I. A. Gamaley¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

We studied the changes in the level of reactive oxygen species (ROS) in normal (3T3) and transformed (3T3-SV40) murine fibroblasts under the antioxidant action for 15 min using fluorescent probe carboxy-H₂DCFDA. We have shown that N-acetylcysteine (NAC) decreased ROS level in both cellular types. Another antioxidant, alpha-lipoic acid (ALA), and its reduced form, dihydrolipoic acid (DHLA), caused the prooxidant effects. Both ALA and DHLA in the concentration range of 0.1—1.25 mM increased ROS level in dose dependent manner in both cellular types. The ability of ALA and DHLA to activate hydrogen peroxide production is discussed.

Key words: reactive oxygen species, N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, dihydrolipoic acid, prooxidant actin.