

ТИОЛОВЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ УВЕЛИЧИВАЮТ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МИЕЛОМЫ МЫШИ SP2/0 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

© В. Ю. Табаков,^{1,2,*} Н. Н. Вейко,¹ В. В. Честков,^{1,2} С. В. Костюк¹

¹ Медико-генетический научный центр, Москва, 115478,

и ² ООО Научно-производственное предприятие ПанЭко, Москва, 115522;

* электронный адрес: biovitr@rambler.ru

В работе продемонстрирована взаимосвязь между присутствием в бессывороточной среде низкомолекулярных RSH-антиоксидантов (N-ацетилцистеина и глутатиона), генерацией активных форм кислорода (АФК) и пролиферативной активностью клеток мышинной миеломы SP2/0-SF. Показано, что присутствие этих соединений в среде в исследуемом диапазоне концентраций изменяло содержание АФК в клетках и оказывало дозозависимое влияние на их пролиферацию. Стимуляция пролиферативной активности не зависела от природы использованного RSH-соединения. Оптимальная концентрация обоих антиоксидантов составляла 0.2 мМ. Дальнейшее увеличение ее приводило к угнетению пролиферации клеток, выраженной в разной степени для N-ацетилцистеина и глутатиона.

Ключевые слова: антиоксиданты, тиолы, N-ацетилцистеин, глутатион, автоокисление, активные формы кислорода, окислительный стресс, пролиферация.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, GSH — восстановленный глутатион, NAC — N-ацетилцистеин, RSH — тиолы.

Антиоксиданты, содержащие тиоловые группы (–SH), широко применяются в лабораторных и биотехнологических процессах для предотвращения окислительного стресса (Deneke, 2000). Эти соединения являются компонентами комплексных клеточных и внеклеточных антиокислительных систем и выполняют роль сквенджеров и низкомолекулярных восстановителей ключевых ферментов, инактивирующих АФК и продукты окислительного повреждения. К ним относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, церулоплазмин, тиоредоксин и др. (Lewin, Porov, 1994). Сыворотки крови, используемые в качестве универсальных комплексных обогатителей большинства питательных сред, обладают собственной внеклеточной системой антиоксидантов, способной нейтрализовать механизмы образования и токсического действия АФК (Клебанов и др., 1999).

Вместе с тем результаты последних исследований показывают, что в системах с ограниченным восстановительным потенциалом, например при культивировании клеток в бессывороточных средах, многие низкомолекулярные антиоксиданты, в том числе RSH-соединения, способны к автоокислению, приводящему к генерации АФК (Long, Halliwell, 2001; Zhang et al., 2001; Соловьева и др., 2007; Cosentino-Gomes, Meyer-Fernandes, 2012). Согласно опубликованным данным, АФК и связанные с ними активные формы азота способны прямо или косвенно поддерживать активность компонентов митогенных каскадов в клетках и стимулировать пролиферацию (Davies, 1999; Cosentino-Gomes, Meyer-Fernandes, 2012).

Цель настоящего исследования — установить наличие взаимосвязи между процессами накопления АФК в результате автоокисления тиолов N-ацетилцистеина (NAC) и глутатиона (GSH) и пролиферацией клеток бессывороточной культуры мышинной миеломы SP2/0.

Материал и методика

Питательные среды и условия культивирования. Клетки линии мышинной миеломы SP2/0-SF, адаптированной к бессывороточным условиям культивирования, получены из криобанка компании ПанЭко (Россия). В качестве основы для экспериментальных и контрольных сред использовали бессывороточную среду Гибрис-2 (ПанЭко, Россия) (Табаков и др., 2009). Для проведения экспериментов 72-часовую культуру клеток миеломы SP2/0-SF, выращенную в 6 мл среды Гибрис-2, собирали центрифугированием, однократно отмывали раствором Дюльбекко (DPBS), ресуспендировали в том же растворе и засеивали в ячейки культуральных планшетов (SPL, Корея) согласно протоколам методов исследования. В экспериментах использовали маточные растворы тиолов (100 мМ) с частичной нейтрализацией их pH (до 6.0). При введении аликвот маточных растворов показатель pH в экспериментальной среде не отличался от контрольной. GSH и NAC были приобретены в компании Sigma (США). Культивирование клеток проводили в условиях CO₂-инкубатора Galaxy-S+ (RS-Biotech, Англия) при 37 °С, 5 % CO₂ и влажности 92 ± 5 %.

Для количественной оценки накопления клеток SP2/0-SF в экспериментальной (RSH-содержащей) и контрольной средах их рассеивали по $4 \cdot 10^4$ в ячейки 6-луночных планшетов, содержащих по 2.5 мл испытуемых сред. Культивировали в течение 96 ч. По окончании культивирования клетки ресуспендировали пипетированием и считали под микроскопом при помощи гемцитометра. Вычисляли общий урожай клеток в каждой экспериментальной ячейке. Гибель клеток в культурах оценивали в процентах от общего урожая по окончании культивирования методом исключения с помощью трипанового синего. Для построения диаграмм использовали пакет программ Microsoft Excel. Статистический анализ проводили по данным четырех независимых экспериментов.

Оценка уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67. По $5.0 \cdot 10^4$ клеток SP2/0-SF, подготовленных, как описано выше, засеивали в ячейки 24-луночного планшета, содержащие по 1.0 мл испытуемых сред. Культивировали в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием, отмывали DPBS и ресуспендировали в 1 мл раствора DPBS, содержащего 2 % параформальдегида (Sigma, США). Фиксацию проводили при 37 °C в течение 10 мин. Затем клетки отмывали 3 раза 0.5%-ным раствором BSA-DPBS и подвергали пермеабиллизации 70%-ным этанолом. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл 0.5%-ного раствора BSA-DPBS и обрабатывали антимишными меченными FITC антителами против Ki-67 (Biolegend, США): 1—2 мкг/мл, 1 ч, при 4 °C в темноте. Клетки (приблизительно 10^4) анализировали на цитофлуориметре FACS CyFlow Cube (Partec, США) с использованием FITC-специфичного набора оптической системы (FL1-laser). Получение и первичную обработку данных цитофлуориметрии осуществляли при помощи Operating and analysis software FloMax (2.60). Для построения диаграмм использовали пакет программ Microsoft Excel. Парное сравнение процентного соотношения частот для выборок независимых распределений флуоресценции в исследуемой области проводили с использованием теста Манна—Уитни. Эксперимент повторяли дважды.

Определение содержания АФК в клетках. Клетки миеломы SP2/0-SF готовили и культивировали в экспериментальных средах в течение 24 ч, как описано в предыдущей методике. За 30 мин до окончания культивирования в ячейки вносили АФК-реактивный зонд $H_2DCFH-DA$ (Invitrogen, США) в конечной концентрации 5 мкМ. Клетки собирали центрифугированием, однократно отмывали и ресуспендировали в 1 мл DPBS. Цитофлуориметрический анализ суспензии клеток (около 10^4) и обработку данных проводили так же, как и в случае определения экспрессии Ki-67. На основании диаграмм флуоресценции окисленного DCF, полученных и обработанных при помощи программы FloMax (2.60), определяли общее количество клеток и среднее значение интенсивности излучения на клетку в рабочем диапазоне показателя интенсивности флуоресценции 1—210. Эксперимент повторяли дважды.

Результаты

Зависимость урожая клеток от концентрации RSH-соединения в бессывороточной среде Гибрис-2 представлена на рис. 1. Полное совпадение графиков на участке возрастания концентрации 0.0—0.2 мМ свидетельствует о

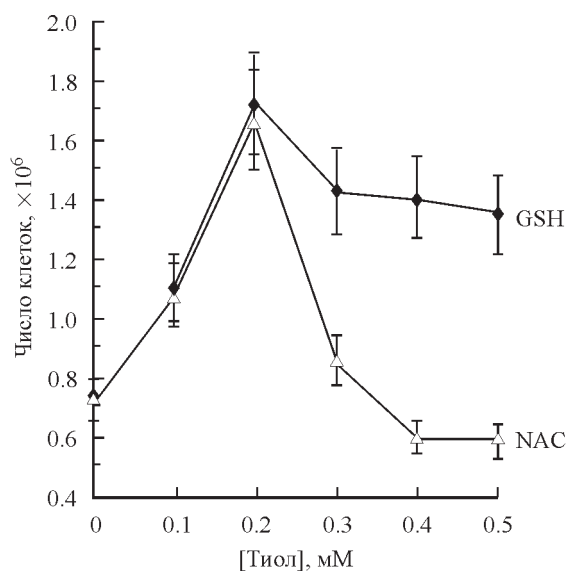


Рис. 1. Зависимость числа клеток в культуре от концентрации тиола в среде культивирования.

Клетки культивировали 72 ч. Представлены средние значения из четырех независимых экспериментов. Вертикальные отрезки показывают доверительные интервалы ($P < 0.05$).

независимости стимулирующего влияния добавляемого тиола (NAC или GSH) на количество клеток от соединения. Очевидно, на данном участке стимулирующая роль связана с процессом, зависящим только от концентрации химически активной функциональной группы SH. В пользу того, что увеличение числа клеток связано с повышенной пролиферативной активностью, свидетельствует сопоставление диаграмм флуоресценции FITC-конъюгированных антител против маркера пролиферации Ki-67 (рис. 2, а, б). Из представленных диаграмм видно, что при введении как одного, так и другого тиола в концентрации 0.1 мМ в состав бессывороточной среды через 24 ч в клетках экспериментальных культур происходит индукция экспрессии Ki-67 по сравнению с клетками контрольной культуры.

Данные по флуоресценции DCF в клетках мышинной миеломы SP2/0-SF свидетельствуют об увеличении содержания АФК при увеличении концентрации SH-соединения в бессывороточной среде Гибрис-2 (рис. 3, а—в; см. таблицу). Анализ полученных результатов наводит на мысль о том, что при концентрации добавляемых тиолов 0.1—0.2 мМ АФК, образующиеся в процессе автоокисления, поддерживают пролиферативную активность в соответствии с механизмом, описанным в разделе «Обсуждение». Можно предположить, что в данном диапазоне концентраций тиолов антиоксидантная система клеток справляется с генерацией избыточных АФК и основные явления окислительного стресса (угнетение пролиферации, апоптотическая гибель клеток) не проявляются. Однако повышение концентрации тиолов в среде до 0.3 мМ приводит к резкому скачку содержания АФК в клетках (данные по флуоресценции DCF свидетельствуют об увеличении содержания АФК в клетках мышинной миеломы SP2/0-SF при увеличении концентрации SH-соединения в бессывороточной среде Гибрис-2 (рис. 3, а—в; см. таблицу)). Это сопровождается угнетением пролиферации по показателям накопления клеток и маркеру Ki-67 (рис. 1, 2). Мы предполагаем, что на данном уровне concentra-

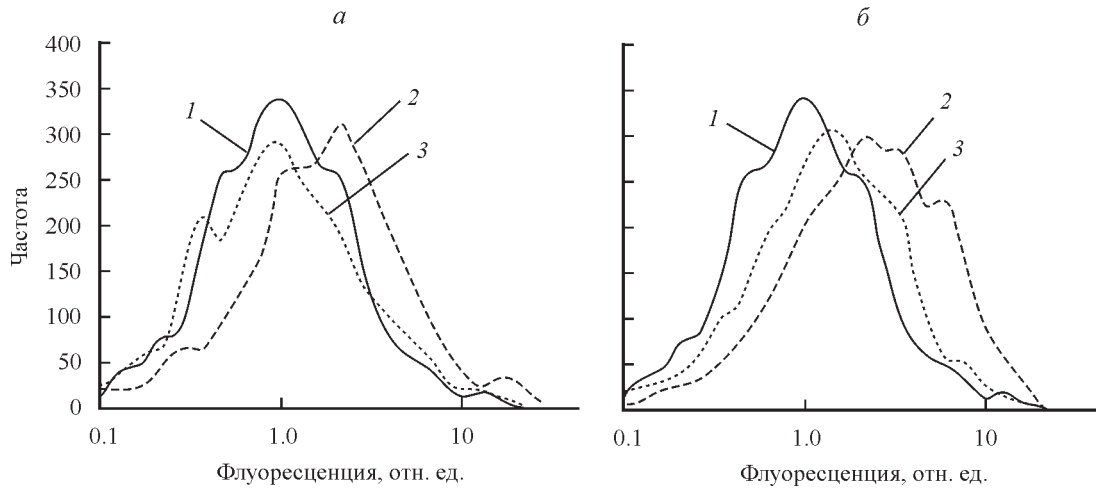


Рис. 2. Влияние тиолов NAC (а) и GSH (б) на экспрессию маркера пролиферации белка Ki-67 в клетках SP2/0. Проточная цитометрия.

Кривые: 1 — контроль, 2 — 0.1 мМ, 3 — 0.3 мМ тиола. Показано распределение интенсивности флуоресценции фиксированных клеток, связанных с FITC-конъюгированными антителами к Ki-67. Различия выборок для процентного соотношения частот (тест Манна—Уитни, $P < 0.05$) достоверны между контролем и 0.3 мМ тиола (а), между контролем и 0.1 (и 0.3) мМ тиола и между концентрациями тиола 0.1 и 0.3 мМ.

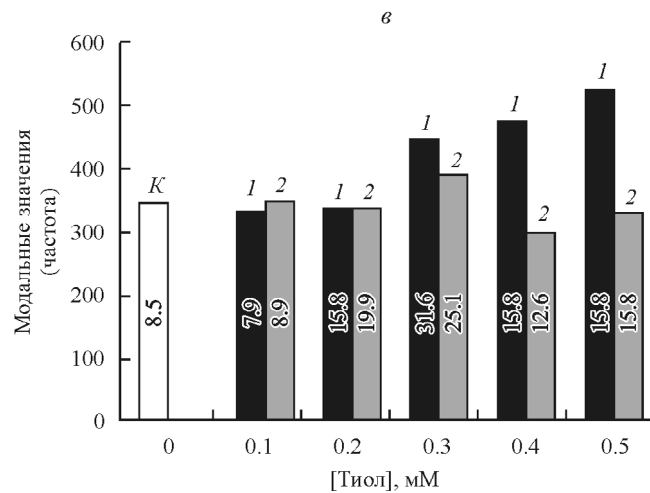
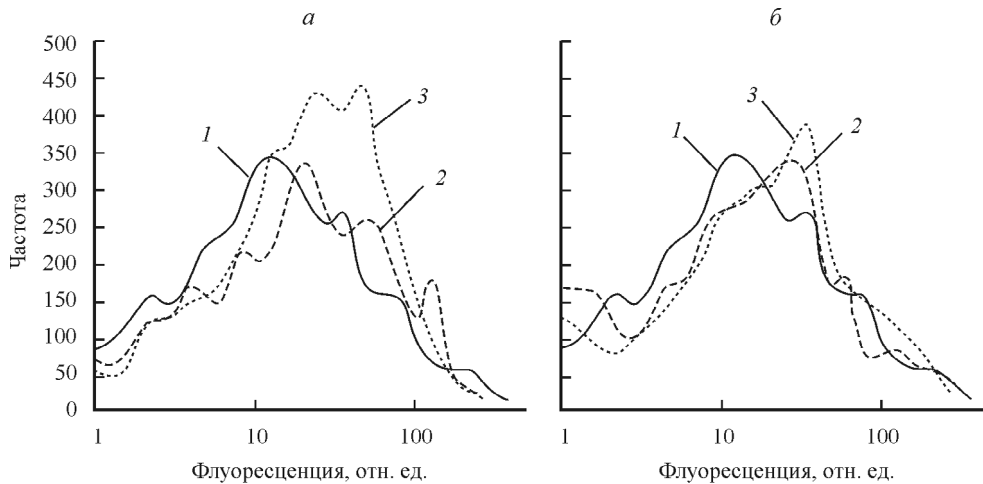


Рис. 3. Влияние NAC (а) и GSH (б) на уровень АФК в клетках SP2/0. Проточная цитометрия.

а, б — распределение интенсивности флуоресценции (ИФ) нефиксированных клеток, окрашенных H₂DCFH-DA; кривые: 1 — контроль, 2 — 0.1 мМ, 3 — 0.3 мМ тиола. в — модальные значения частот распределения клеток по ИФ в контроле (К), в присутствии NAC (столбцы 1) и GSH (столбцы 2) при различных концентрациях. (Соответствующие показатели ИФ указаны на столбцах диаграммы.) Различия выборок для процентного соотношения частот (тест Манна—Уитни, $P < 0.05$) достоверны между контролем и 0.2 (или 0.3) мМ тиола (а, б).

**Уровень АФК в клетках миеломы SP2/0
при различных концентрациях R-SH-соединений в среде Гибрис-2**

[Тиол], мМ	NAC		GSH	
	доля клеток в рабочем диапазоне флуоресценции, %	АФК, усл. ед./кл.	доля клеток в рабочем диапазоне флуоресценции, %	АФК, усл. ед./кл.
0 (-зонд)	0.18	13.86	0.18	13.86
0 (+зонд)	41.46	63.74	41.46	63.74
0.1	42.30	65.29	42.86	62.88
0.2	40.12	68.94	39.44	63.24
0.3	47.02	72.48	39.22	68.35
0.4	47.72	70.08	36.90	68.31
0.5	51.14	71.63	36.54	65.30

Примечание. Результаты регистрировали через 1 сут после посева клеток в контрольную и экспериментальные среды. Зонд $H_2DCFH-DA$ добавляли за 30 мин до измерения интенсивности флуоресценции (ИФ). Значения АФК рассчитывали по показателю суммарной ИФ в рабочем диапазоне измерений в пересчете на 1 клетку (усл. ед./кл.).

ций добавляемых тиолов происходит декомпенсация антиокислительной системы клеток и индукция механизмов окислительного стресса. Следует отметить, что мы не наблюдали увеличения гибели клеток в экспериментальных культурах, содержащих субоптимальные концентрации тиолов 0.3—0.5 мМ, несмотря на выраженное угнетение пролиферации. Выживаемость клеток в контроле и в присутствии тиола во всем диапазоне исследуемых концентраций варьировала от 96.3 до 97 %. Вместе с тем различная динамика угнетения клеточной популяции (рис. 1) и генерации АФК при концентрациях RSH, превышающих 0.2 мМ (рис. 3; см. таблицу), свидетельствуют о различиях между механизмами антиокислительного действия GSH и NAC в антиокислительной системе клеток.

Обсуждение

Из литературы известно, что различные соединения из группы тиолов (цистеин, гомоцистеин, NAC, меркаптоэтанол и GSH) способны к автоокислению при повышенных концентрациях *in vivo* и *in vitro* с положительным влиянием на пролиферацию клеток (Broome, Jeng, 1973; Zhang et al., 2001; Noda et al., 2002).

Каскадный механизм реакций автоокисления тиолов в растворах, содержащих ионы переходных металлов, был предложен Мисра (Misra, 1974). Химически активными продуктами этого процесса являются АФК (супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , гидроксильный радикал OH^{\bullet} и их производные). Высокие концентрации АФК, наблюдаемые при различных физиологических и патологических состояниях клеток и тканей, приводят к повреждению молекул и замедлению пролиферации клеток, активируя каскадные реакции окислительного стресса (Waris, Ahsan, 2006). В то же время в ряде современных исследований показано, что увеличение концентрации АФК является атрибутом митогенной активации клеток, а некоторые из них, такие как H_2O_2 , могут рассматриваться в качестве вторичных мессенджеров митогенных каскадов (Sundaresan et al., 1995; Vae et al., 1997, 2000; Mahadev et al., 2004).

Молекулярной мишенью при реализации пропролиферативной активности АФК в данном случае является многочисленная группа клеточных регуляторных белков

протеинтирозинфосфатаз (РТР). Роль РТР в регуляции митогенной активности связана с инактивацией протеинкиназ, вовлеченных в каскадные механизмы митогенной активации (тирозинкиназы клеточных рецепторов факторов роста, MAP-киназы, первичные эффекторы митогенной стимуляции на уровне циклинкиназных комплексов, факторы транскрипции) (Ostman et al., 2011; Cosentino-Gomes, Meyer-Fernandes, 2012).

Автоокисление тиолов в случае их высокой концентрации и ограниченного восстановительного потенциала внеклеточной среды приводит к образованию высоких концентраций АФК, способных проникать в клетки и ингибировать активность РТР посредством обратимого окисления SH-групп остатков цистеина. Инактивация комплекса клеточных РТР в свою очередь обуславливает поддержание фосфорилированного состояния киназных компонентов митогенных каскадов и высокую активность механизма митогенной стимуляции клеток (Li et al., 2000; Chan et al., 2001; Zhang et al., 2001).

Известно, что клетки постоянных клеточных линий в отличие от клеток первичных культур и диплоидных псевдолиний не нуждаются в регуляции клеточного цикла со стороны специальных факторов, продуцируемых клетками и тканями многоклеточного организма. Это связано с конститутивной экспрессией элементов систем митогенных каскадов в клетках этих линий (Табаков и др., 2013). Поддержание высокой активности фосфорилированных белков митогенных каскадов должно обеспечивать высокую скорость прохождения этапов клеточного цикла и как следствие — высокую митотическую активность в культуре.

В настоящей работе мы показали, что низкомолекулярные антиоксиданты с восстановленной тиоловой группой приводят к накоплению АФК в клетках бессывороточной культуры мышиной миеломы SP2/0-SF. На основании полученных результатов мы предполагаем, что изменение пролиферативных свойств бессывороточной культуры клеток SP2/0-SF в присутствии антиокислителей тиолов связано с механизмом автоокисления этих соединений в бессывороточной среде и образования пула вторичных мессенджеров пролиферативных каскадов в виде АФК. Обнаруженные в ходе исследования различия между GSH и NAC при концентрациях, превышающих 0.2 мМ, могут быть связаны с вовлечением до-

полнительных механизмов внутриклеточной антиоксидантной системы и (или) различными уровнями прооксидантной активности тиолов (Menon et al., 2007; Vivancos et al., 2010). Известно, что природный антиоксидант GSH в отличие от NAC является активным компонентом ферментативного звена антиоксидантной системы клетки, которая индуцируется окислительным стрессом и противодействует накоплению АФК, а также продуктов окислительных и свободнорадикальных реакций (Go, 2008; Deponte, 2013). В то же время NAC способен активно включаться в физиологическую систему антиоксидантной защиты в качестве предшественника синтеза GSH (Sen, Packer, 2000; Whillier et al., 2009). Прооксидантные свойства NAC, вводимого в сывороточные среды в высоких концентрациях (5—20 мМ), описаны в ряде независимых исследований на культурах линий фибробластов мыши 3Т3 (Ефремова и др., 2004; Menon et al., 2007). Авторы отмечали увеличение уровня АФК, стимуляцию экспрессии маркеров апоптоза, торможение клеточного цикла на стадии G₁ и ингибирование пролиферации клеток 3Т3 в культуре *in vitro*. Представленные в настоящей работе данные согласуются с результатами исследований, характеризующими NAC в качестве более легкоокисляемого тиола по сравнению с глутатионом (Munday, 1989; Held, Biaglow, 1994; Deponte, 2013). Накопление больших некомпенсируемых количеств АФК при концентрациях NAC, превышающих 0.2 мМ, очевидно, приводит к более выраженным проявлениям окислительного стресса и сопровождается значительным угнетением пролиферативной активности клеток (Davies, 1999).

Природные тиолы на основе цистеина представляют собой важнейший компонент буфера, обеспечивающего поддержание редуцирующего потенциала антиоксидантной системы у аэробных организмов (Sen, Packer, 2000; Atmaca, 2004). Необходимость поддержания пула тиолов в восстановленной форме для противодействия окислительному стрессу в культуре клеток вне организма продемонстрирована рядом исследований (Aoshiba et al., 1999; Люблинская и др., 2013). Однако значительная вариабельность условий, создаваемая при культивировании клеток *in vitro*, часто способствует изменению антиоксидантных свойств этих соединений на прооксидантные (Halliwell, 2014). Это приводит к опосредованной инверсии окислительно-восстановительных реакций с участием антиоксидантов (так называемый редокс-парадокс) (Chan et al., 2001). Вместе с тем это одновременно открывает возможность практического применения данного феномена для повышения эффективности процесса культивирования клеток.

Таким образом, использование антиоксидантов, нестабильных в условиях культуры клеток, в специально подобранных концентрациях может рассматриваться в качестве потенциального инструмента регуляции клеточного цикла при культивировании клеток перевиваемых линий в бессывороточных средах.

Список литературы

- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки активного цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403. (Efremova T. N., Kirpichnikova K. M., Khaitlina S. Yu., Gamaley I. A. 2004. Antioxidants-induced rearrangements of actin cytoskeleton in 3T3 and 3T3-SV40 fibroblasts. Tsitologiya. 46 (5) : 395—403.)
- Клебанов Г. И., Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Любичкий О. Б., Владимиров Ю. А. 1999. Антиоксидантная активность сыворотки крови. Вестн. РАМН. 2 : 15—22. (Klebanov G. I., Teselkin J. O., Babenkova I. V., Lyubitsky O. B., Vladimirov Yu. A. 1999. The antioxidant activity of blood serum. Vestnik RAMS. 2 : 15—22.)
- Люблинская О. Г., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2013. Сравнительное влияние антиоксидантов на уровень активных форм кислорода в нормальных и трансформированных фибробластах. Цитология. 55 (10) : 732—736. (Lyublinskaya O. G., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. 2013. Antioxidant action on the level of reactive oxygen species in normal and transformed fibroblasts. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 (1) : 33—38.)
- Соловьева М. Е., Соловьев В. В., Фасхутдинова А. А., Кудрявцев А. А., Акатов В. С. 2007. Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетаниях с витамином В_{12b}. Цитология. 49 (1) : 70—78. (Solov'eva M. E., Solov'ev V. V., Fashkutdinova A. A., Kudryavtsev A. A., Akatov V. S. 2007. Prooxidant and cytotoxic action of N-acetylcysteine and glutathione in combinations with vitamin B_{12b}. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 1 (1) : 40—49.)
- Табаков В. Ю., Литвина М. М., Щепкина Ю. В., Ярулин А. А., Честков В. В. 2009. Исследование особенностей пролиферации Т-лимфоцитов периферической крови человека в бессывороточной среде. Клеточные технол. биол. мед. 1 : 10—16. (Tabakov V. Yu., Litvina M. M., Schepkina Yu. V., Jarilin A. A., Chestkov V. V. 2009. Studying the proliferation of human peripheral blood T-lymphocytes in serum-free medium. Bull. Exp. Biol. Med. (Cell Tech. Biol. Med.). 147 (1) : 120—124.)
- Табаков В. Ю., Щепкина Ю. В., Честков В. В. 2013. Современные принципы классификации и разработки питательных сред для культивирования клеток человека и животных. Клеточные технол. биол. мед. 1 : 47—57. (Tabakov V. Yu., Schepkina Yu. V., Chestkov V. V. 2013. Modern principles of classification and development of nutrient media for culturing of human and animal cells. Bull. Exp. Biol. Med. (Cell Tech. Biol. Med.). 155 (1) : 164—171.)
- Aoshiba K., Yasui S., Nishimura K., Nagai A. 1999. Thiol depletion induces apoptosis in cultured lung fibroblasts. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21 : 54—64.
- Atmaca G. 2004. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Med. J. 45 : 776—788.
- Bae Y. S., Sung J. Y., Kim O. S., Kim Y. J., Hur K. C., Kazlauskas A., Rhee S. G. 2000. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. J. Biol. Chem. 275 : 10 527—10 531.
- Broome J. D., Jeng M. W. 1973. Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides *in vitro*. J. Exp. Med. 138 : 574—592.
- 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.
- Cosentino-Gomes D., Meyer-Fernandes J. R. 2012. Reversible inhibition of tyrosine protein phosphatases by redox reactions. In: Enzyme inhibition and bioapplications. InTech (www.intechopen.com). 253—276.
- Davies K. J. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. IUBMB Life. 48 : 41—47.
- Deneke S. M. 2000. Thiol-based antioxidants. Curr. Top. Cell Regul. 36 : 151—180.
- Deponte M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochim. biophys. acta. 1830 : 3217—3266.
- Go Y.-M., Jones D. P. 2008. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Biochim. biophys. acta. 1780 : 1273—1290.
- Halliwell B. 2014. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. Biomed. J. 37 : 99—105.
- 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.

Lewin G., Popov I. 1994. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences. *Med. Hypotheses*. 42 : 269—275.

Li W., Dehnade F., Zafarullah M. 2000. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signalling pathway in articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 : 789—794.

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.

Mahadev K., Motoshima H., Wu X., Ruddy J. M., Arnold R. S., Cheng G., Lambeth J. D., Goldstein B. J. 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 1844—1854.

Menon S. G., Sarsour E. H., Kalen A. L., Venkataraman S., Hitchler M. J., Domann F. E., Oberley L. W., Goswami P. C. 2007. Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G₁ arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 67 : 6392—6399.

Misra H. P. 1974. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* 249 : 2151—2155.

Munday R. 1989. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.* 7 : 659—673.

Noda T., Iwakiri R., Fujimoto K., Rhoads C. A., Aw T. Y. 2002. Exogenous cysteine and cystine promote cell proliferation in CaCo-2 cells. *Cell Proliferation*. 35 : 117—129.

Ostman A., Frijhoff J., Sandin A., Bohmer F.-D. 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J. Biochem.* 150 : 345—356.

Sen C. K., Packer L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Amer. J. Clin. Nutr.* 72 : 653S—669S.

Sundaresan M., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270 : 296—299.

Vivanco P. D., Wolff T., Markovich E., Pallard F. V., Foyer C. H. 2010. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *J. Biochem.* 431 : 169—178.

Waris G., Ahsan H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinogenesis*. 5 : 14.

Whillier S., Raftos J. E., Chapman B., Kuchel P. W. 2009. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep.* 14 : 115—124.

Zhang Q., Zeng X., Guo J., Wang X. 2001. Effects of homocysteine on murine splenic B lymphocyte proliferation and its signal transduction mechanism. *Cardiovas. Res.* 52 : 328—336.

Поступила 15 III 2016

RSH ANTIOXIDANTS INCREASE INTRACELLULAR ROS LEVEL AND PROLIFERATION OF SP2/0 MYELOMA CELLS IN SERUM-FREE MEDIUM

V. Yu. Tabakov,^{1,2,*} N. N. Veiko,¹ V. V. Chestkov,^{1,2} S. V. Kostyuk¹

¹ Research Centre of Medical Genetics, Moscow, 115478, and

² PanEco-Ltd Research and Production Biomedical Company, Moscow, 115522;

* e-mail: bioivtr@rambler.ru

At present research we have demonstrated the link between introducing of low molecular weight RSH-antioxidants (N-acetylcysteine, glutathione) into serum-free medium composition, reactive oxygen species (ROS) generation and mouse myeloma SP2/0-SF cells proliferative activity. The presence of these compounds in the medium changed the pattern of ROS-activity in cells by concentration-dependent manner, and affected their proliferative characteristics. The optimal value of the proliferative activity was related to 0.2 mM for both thiols and not depended from the thiol-compound nature. Further increasing up from the found concentration optimum lead to growth inhibition with different expression for N-acetylcysteine and glutathione.

Key words: antioxidants, thiols, N-acetylcysteine, glutathione, oxidative stress, reactive oxygen species, autooxidation, proliferation.