

УДК 577.346:576.32

МЕХАНИЗМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ТРЕТ-БУТИЛГИДРОПЕРЕКСИДОМ ИЛИ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Л. Б. Заводник¹, Е. А. Лапшина², Т. Н. Будко¹, В. И. Кондаков¹,
А. М. Хоха¹, И. Б. Заводник²

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28

e-mail: leuzavodnik@yandex.ru)

² – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, г. Гродно 230010, БЛК 50)

Ключевые слова: окислительные повреждения, трет-бутилгидроперекись, облучение, ОН-радикал, двойные разрывы ДНК, мембранные повреждения.

Аннотация. Целью нашей работы было выявление механизмов повреждений клеток различными окислительными агентами. Исследовалось содержание SH-групп мембранных белков, накопление субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, рост колоний и появление двойных разрывов ДНК в культуре клеток В14 китайского хомячка. Повреждение вызывали воздействием рентгеновского облучения, гитохлорной кислотой или трет-бутилгидроперекиси. Полученные результаты указывают на различный механизм окислительных повреждений НОС1 в отличие от гидроперекиси или радиоактивности.

MECHANISM OF OXIDATIVE DAMAGE OF CELLS BY T-BUTYL HYDROPEROXIDE AND BY X-RAYS

L. B. Zavodnik¹, E. A. Lapshina², T. N. Budko¹, V. I. Kondakov¹,
A. M. Khokha¹, I. B. Zavodnik²

¹ – EI «Grodno State Agrarian University»

(Belarus, Grodno, 230008, 28 Tereshkova st.

e-mail: leuzavodnik@yandex.ru

² – Y. Kupala Grodno State University

230010, BLK 50, Grodno, Belarus

Key words: oxidative damage, t-butyl-hydroperoxide, Irradiation, OH-radicals, DNA double-strand break, membrane damage

Summary. Was investigate the mechanism(s) of X-ray-mediated cell damage in comparison to mechanism(s) of organic hydroperoxide cytotoxicity and to find the main targets for the two different kinds of cell inactivation. Damage of Chinese hamster fibroblasts induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) or X-irradiation was measured by the colony-formation assay and the average single colony volume. Oxi-

ductive damage of fibroblasts induced by t-BHP or by X-rays inhibits cell proliferation. The similar decrease of cell proliferation can be caused by DNA dsb without detectable membrane damage (X-radiation) as by membrane damage with nearly no DNA dsb (chemically induced oxidative stress).

(Поступила в редакцию 01.06.2016 г.)

Введение. Реактивные кислородные радикалы наряду с активными формами хлора участвуют в развитии многих патологических процессов во всех аэробных организмах и образуются в живых клетках при физиологических процессах (как побочные продукты метаболизма ксенобиотиков или в результате движения электронов по клеточным электрон-транспортным цепям), при действии внешних факторов (облучение, интоксикация) [2, 3].

Механизмы гибели клеток при действии H_2O_2 и ионизирующей радиации широко изучались ранее с использованием фибробластов как модельных клеток [1, 5, 7]. Многочисленные исследования на клетках млекопитающих показали, что цитотоксичность окислительных агентов сопровождается повреждениями ДНК, а восстановление этих повреждений является необходимым условием выживания клетки [1, 4]. Различные виды повреждений ДНК выявлены и при воздействии перекиси водорода на фибробласты: это двух- и однонитевые разрывы и повреждение оснований (накопление 8-окси-2'-деокси-гуанозина) [6]. Было предположено, что именно двойные разрывы ДНК, а не однонитевые, имеют значение при повреждении клеток, вызванных гидроксил-радикалами [10]. Однако, как предполагают, двухнитевые разрывы ДНК, индуцируемые гидроксильными радикалами, генерируемыми при экспозиции перекиси водорода, менее выражено действуют на клетки млекопитающих, чем ОН-радикалы, возникающие при воздействии рентгеновских лучей [1, 3, 7].

Цель работы: изучить механизмы повреждения клеточных мембран различными окислительными агентами. Водорастворимая гидроперекись, гипохлорная кислота и рентгеновское облучение сравнивали между собой, как пример химических и физических агентов.

Материалы и методы исследований. Рост перитонеальных фибробластов линии В14 китайского хомячка проводили в виде монослоя в минимально необходимой среде Игла с солями Хенкса, содержащей 10% сыворотку новорожденных телят. Клетки обрабатывали различными концентрациями *трет*-бутилгидропероксида (*тБГП*) и гипохлорной кислоты при 22° С. Оксидант добавляли (одномоментно) в виде 100 мМ (для *тБГП*) или 25 мМ (гипохлорита натрия) раствора и суспензию перемешивали.

Рентгеновское облучение клеток китайского хомячка. Клетки облучали на рентгеновской установке («Seifert», Германия) при нагрузке 120 кВ с Al фильтром 1 мм. Мощность дозы составляла 1 Гр/мин. Только для определения индуцируемых облучением двойных разрывов ДНК использовали охлаждение до 4°C для предотвращения репараций.

Определение роста колоний. Клетки инкубировали в течение 7 дней в газовом инкубаторе с увлажненным CO₂. Число колоний и их средний размер определяли в трех чашках Петри при каждой дозе облучения.

Определение целостности ДНК методом гель-электрофореза в постоянном поле. Для оценки степени повреждения ДНК проводили электрофорез клеток в постоянном поле. Гели выдерживали при 15°C в течение 20 ч в постоянном поле при силе тока 1,5 Вт м⁻¹. Затем окрашивали в течение 24 ч в этимидиум бромиде и отмывали в течение 6 ч.

Оценку геля проводили при УФ-облучении (312 нм) с использованием специальной лампы («Bioblock», Франция) и фотографировали с оранжевым фильтром (GG 530, Schott, Германия). Была определена интенсивность флуоресценции геля и рассчитаны доли нативной ДНК.

Результаты исследований и их обсуждение. Окислительные повреждения клеток, вызванные в наших экспериментах органическим гидроксидом (*тБГП*) или рентгеновским излучением, ингибировали пролиферацию фибробластов китайского хомячка, которую мы измеряли по способности клеток к формированию колоний. Зависимость числа образовавшихся колоний (*S*) от дозы (*D*) рентгеновского облучения или концентрации *тБГП* в среде может быть описана с помощью логарифмического уравнения (рисунок 1):

$$\log S = -\alpha D - \beta D^2 - \gamma.$$

т. е. представляет квадратичную зависимость степени повреждения от дозы эффектора.

Эффект 10 Гр соответствует эффекту инкубации с 0,75 мМ *тБГП* при 37°C в течение 1 ч. Оценка ингибирования пролиферации фибробластов по величине среднего объема отдельных колоний выявила аналогичный результат.

Выживаемость клеток линии В14 подобным образом резко падала при инкубации с ещё одним окислительным агентом – гипохлорной кислотой (рисунок 2).

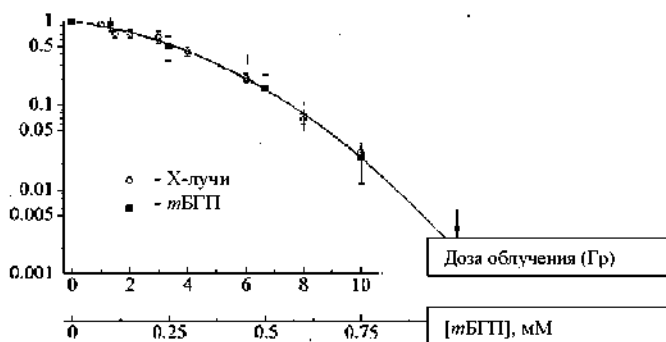


Рисунок 1 – Зависимость количества образовавшихся колоний фибробластами китайского хомячка линии В14 от дозы рентгеновского облучения или концентрации *mBГП*

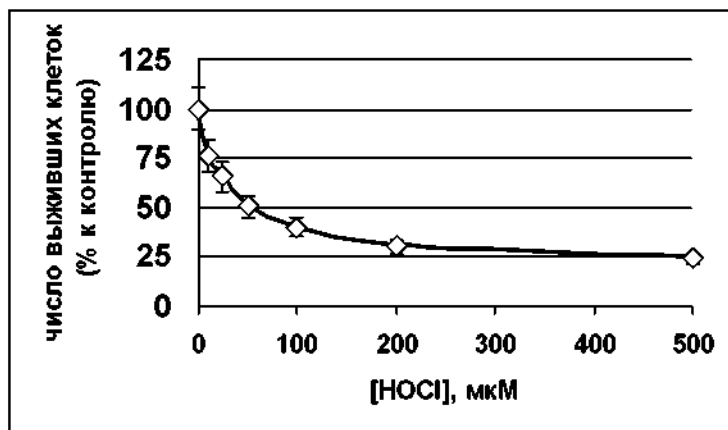


Рисунок 2 – Зависимость числа выживших клеток линии В14 от концентрации гипохлорной кислоты. Клетки инкубировали с окислителем в течение 1 ч, 37° С, рН 7,4

При действии HOCl в культуре клеток мы наблюдали быструю потерю жизнеспособности. При повышении концентрации окислителя до 100 мкМ число выживших клеток снижалось более чем на 60%, а при 500 мкМ HOCl только 20% клеток оставались жизнеспособными.

Цитотоксический эффект органической гидроперекиси *mBГП* и рентгеновского излучения сопровождался образованием двойных разрывов ДНК. После окислительных повреждений клеток китайского хомячка как облучением, так и химическим окислителем, процент раз-

рывов молекул ДНК зависел от дозы фактора. Облучение приводило к более выраженному повреждению ДНК в зависимости от дозы, в то время как инкубация клеток с *т*БГП лишь незначительно изменяла долю нативной ДНК. После воздействия дозы 10 Гр число выживших клеток снижалось до 2,5%, при этом 25% ДНК претерпевало фрагментацию, что соответствует 400 ДРД/клетку.

Таблица 1 – Повреждение ДНК клеток линии В14 и окисление SH-групп различными концентрациями HOSCl и H₂O₂ через 1 ч инкубации (рН 7,4, 37°C)

Воздействие	Общее содержание SH-групп, нмоль/10 ⁶ клеток	Кол-во нефрагментированных молекул ДНК, %	Кол-во фрагментированных молекул ДНК, %
контроль	30,4 ± 4,9	93,3 ± 5,9	6,7 ± 1,9
HOSCl 0,5 мМ	23,9 ± 2,3*	85,9 ± 5,3*	14,1 ± 1,7
1,0 мМ	17,3 ± 2,2*	84,3 ± 7,2*	15,8 ± 1,8,*
H ₂ O ₂ 40 мкМ	-	65,5 ± 6,1*	34,5 ± 5,3*
100 мкМ	-	41,7 ± 5,3*	58,4 ± 7,8*

Примечание: * $p < 0,05$ относительно контрольной группы

Гипохлорная кислота, подобно рентгеновскому излучению и органическому гидропероксиду, вызывала фрагментацию ДНК в клетке (таблица 1).

Количество целых молекул ДНК после инкубации с 0,5 мМ HOSCl уменьшилось на 9,1%. Для сравнения, инкубация в нашем эксперименте с 0,04 мМ H₂O₂ вызывала падение числа нефрагментированных молекул ДНК на 38% по отношению к контролю.

Другая мишень окислительного повреждения клеток – плазматическая мембрана. Степень пероксидации мембранных липидов мы определяли по количеству образовавшихся ТБКРС. Только химически вызванное окисление в используемой дозе, но не рентгеновское облучение изолированных клеток, существенно изменило количество перекисных продуктов в мембранах клеток линии В14 китайского хомячка (таблица 2).

Определение содержания SH-групп в мембранах клеток показало, что окислительное действие *т*БГП приводило к их снижению. Если до обработки было ~ 5,5 нмоль SH-групп/10⁶ незлизованных клеток китайского хомячка, то после инкубации клеток в течение 1 ч с 1,0 мМ *т*БГП только 37 ± 4% SH-групп не было окислено. Дальнейшее увеличение концентрации *т*БГП до 2,0 ммол/л изменило этот показатель незначительно. Напротив, окисление SH-групп при облучении вызывалось только очень высокими дозами рентгеновского излучения, даже после воздействия 200 Гр сохранено около 80% SH-групп.

Подобным образом НОС1 также снижала содержание сульфгидрильных групп в клетках линии В14. 1 мМ НОС1 (что соответствует 1 мкмолью окислителя/10⁶ клеток) в течение 1 ч инкубации уменьшает общее содержание SH-групп в клетках на ~ 40% (таблица 1). В то же время снижение числа жизнеспособных клеток на ~ 40% мы наблюдали при концентрации окислителя ~ 4 мкмолья НОС1/10⁶ клеток. Таким образом, можно сделать заключение, что истощение клеточных тиолов предшествует гибели клеток.

Таблица 2 – Количество ТБКРС, образующихся после воздействия на фибробласты китайского хомячка тБГП или рентгеновского облучения

тБГП, мМ	ТБКРС нмоль/10 ⁹ клеток	Доза (Гр)	ТБКРС нмоль/10 ⁹ клеток
0	23,0 ± 4,0	0	23,0 ± 1,8
0,5	22,3 ± 5,0	10	20,4 ± 1,3
1,0	24,1 ± 4,7	30	22,5 ± 1,4
2,0	30,3 ± 6,0*	50	21,5 ± 2,3
----	----	100	21,2 ± 1,4

Примечание: * $p < 0,05$ относительно контроля

Различными авторами показано, что выраженные повреждения фибробластов могут быть связаны как с прямым окислительным воздействием на клеточные компоненты, в первую очередь ядро и мембраны, так и активацией или модуляцией различных клеточных каскадов трансдукции сигнала окислительными агентами [8, 9].

Нами была продемонстрирована быстрая потеря способности клеток линии В14 к пролиферации при окислительном стрессе, индуцируемом рентгеновским излучением или инкубацией с соответствующими концентрациями тБГП и НОС1. Во всех случаях происходили окислительные повреждения клеток, но по различным механизмам и с весьма различными последствиями. При рентгеновском облучении основная клеточная мишень – ДНК, что отражалось в количестве двойных разрывов, коррелирующих с инактивацией клеток (рисунок 2), но при этом отсутствовали изменения мембраны: окисление SH-групп мембранных белков и перекисидация липидов (таблица 1).

После обработки тБГП главные изменения в клетках происходили в мембране, что проявлялось в окислении SH-групп без увеличения образования перекисей липидов (рисунок 2, таблица 2). Подобным образом НОС1 эффективно окисляла SH-группы в фибробластах китайского хомячка (таблица 1), уменьшая число жизнеспособных клеток.

Заключение. Клеточная ДНК может быть повреждена прямым и косвенным воздействием ионизирующего излучения. Если облучение произведено рентгеновскими лучами на воздухе, то ~70% повреждений

является следствием косвенного эффекта [10]. Это означает следующее: основную роль в повреждении ДНК играют ОН-радикалы, потому что гидратированные электроны и Н-радикалы взаимодействуют с кислородом. Так как сами молекулы ДНК содержат связанную воду, вероятно, ОН-радикалы также вовлечены в прямой эффект. Ситуация с химически индуцируемым окислительным эффектом тБГП очень отличается от того, что происходит при облучении. Клетки инкубируются в среде, содержащей окислительный агент в ≥ 1000 раз более высокой концентрации, чем ОН-радикалы, генерируемые радиацией, и в течение намного более длительного времени. Высока вероятность того, что самая высокая концентрация оксиданта наблюдается в мембране и поэтому главной мишенью повреждения является именно она. После химически индуцированного окисления мы обнаружили уменьшение числа мембранных SH-групп, а рост перекисидации липидов – только при значительных концентрациях оксиданта. Первичной мишенью химического окислительного агента выступают белковые и небелковые SH-группы. Они защищают другие компоненты клетки при окислительном воздействии [9, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradley, M. O. Comparison of the effects of hydrogen peroxide and X-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells / M. O. Bradley, L. C. Erickson // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 654. – P. 135-141.
2. Hoffmann, M. E. Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and yield of DNA strand breaks in cells of different species / M. E. Hoffmann, A. C. Mello-Filho, R. Meneghini // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 781. – P. 234-238.
3. Krokosz, A. The effect of hypochlorite on human erythrocytes pretreated with X-radiation / A. Krokosz // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2003. – Vol. 8, N 1. – P. 215-219.
4. Merker, K. Hydrogen peroxide-mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts / K. Merker, N. Sitte, T. Grune // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 375, N. 1. – P. 50-54.
5. Premature induction of aging in sublethally H₂O₂-treated young MRC5 fibroblasts correlates with increased glutathione peroxidase levels and resistance to DNA breakage // R. Caldini [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* – 1998. – Vol. 105, N. 1-2. – P. 137-150.
6. Riley, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation / P. A. Riley // *Int. Journal of Radiation Biology.* 1994. – Vol. 65. – P. 27-33.
7. Spitz, D. R. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts / D. R. Spitz, W. C. Dewey, G. C. Li // *J. Cell Physiol.* – 1987. – Vol. 131, N. 3. – P. 364-373.
8. Teixeira, H. D. Chinese hamster fibroblasts overexpressing Cu,Zn-superoxide dismutase undergo a global reduction in antioxidants and an increasing sensitivity of DNA to oxidative damage / H. D. Teixeira, R. Meneghini // *Biochemical Journal.* – 1996. – Vol. 315. – P. 821-825.
9. Teramoto, S. Nitric oxide and impaired oxygenation before and after liver transplantation / S. Teramoto, T. Matsuse, Y. Ouchi // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 131, N. 1. – P. 69.
10. Yamada, T. The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes / T. Yamada, R. Sawada, T. Tsuchiya // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29, N 26. – P. 3503-3513.