

УДК 577.3:341.19.05.09.11

©Мартинович, Черенкевич

УТИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ АМНИОНА ЧЕЛОВЕКА

Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич

Белорусский государственный университет, Беларусь, 220050, г. Минск,
пр. Фр. Скорины, 4; тел.: 226-58-36; факс 2095445; эл. почта: martinovichgg@bsu.by

Предложен метод определения внутриклеточного содержания оксидантов, основанный на анализе изменений скорости окисления флуоресцентного зонда – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина. С учетом экспериментальных данных построена теоретическая модель диффузии и утилизации пероксида водорода в клетке, позволяющая количественно определить величину градиента концентрации пероксида водорода через клеточную мембрану. Установлено, что коэффициент проницаемости H_2O_2 через плазматическую мембрану для клеток амниона человека равен $(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$. Определены кинетические параметры процессов утилизации внутриклеточного пероксида водорода в клетках.

Ключевые слова: пероксид водорода, 2,7-дихлорофлуоресцеин, окислительный стресс, редокс-регуляция, коэффициент проницаемости, флуоресцентный анализ.

ВВЕДЕНИЕ. В организме человека основное количество поглощаемого кислорода (95-98%) расходуется на окислительный катаболизм субстратов и синтез аденозинтрифосфата. Относительно небольшая часть молекулярного кислорода (2-5%) превращается в активные формы кислорода (АФК) и затем частично используется для окисления макромолекул. Синтез АФК и окисление макромолекул всех классов (нуклеиновых кислот, липидов и белков), происходящие во всех клетках, являются обязательными функционально значимыми биологическими процессами [1]. Однако, при избыточном уровне АФК клетки повреждаются, что способствует развитию старения [2,3], атеросклероза [4], инфаркта и инсульта [5,6], болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, амиотрофического бокового склероза [7,8] и многих других. Установлено, что развитие окислительного стресса и, как следствие, свободнорадикальной патологии зависит от соотношения оксидантов и антиоксидантов в клетке.

Совокупность антиоксидантов представляет собой своего рода восстановительный буфер клетки, емкость которого определяет способность клетки ликвидировать окислитель. Восстановительный буфер клетки определяет концентрацию различных оксидантов в клетке в любой момент времени. Вопрос количественного определения способности клеток ликвидировать окислитель интересует исследователей уже более десяти лет [9,10]. Для изучения процессов клеточной утилизации оксидантов представляется перспективным использовать флуоресцентный зонд – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин (H_2DCF). В экспериментальных исследованиях H_2DCF используется как для регистрации внутриклеточного уровня пероксида водорода [11-13], так и в качестве индикатора

окислительного стресса [14,15]. 2,7-Дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (H₂DCF-DA) легко проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму H₂DCF [16]. H₂DCF – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин (DCF) [17]. При росте внутриклеточного уровня оксидантов увеличивается скорость окисления H₂DCF. Увеличение скорости окисления H₂DCF также может быть опосредовано снижением внутриклеточного уровня антиоксидантов [18]. В настоящее время показано, что этот пигмент можно использовать для определения эффективности некоторых антиоксидантных компонентов клетки [19]. Однако, до сих пор возможность использования H₂DCF для количественной оценки внутриклеточного содержания оксидантов не изучали.

В настоящей работе предложен метод определения внутриклеточного содержания оксидантов, основанный на анализе изменений скорости окисления H₂DCF и позволяющий оценить устанавливающийся уровень внутриклеточной концентрации пероксида водорода ([H₂O₂]_{in}) при экспозиции клеток к экзогенному пероксиду водорода. ([H₂O₂]_{out}).

МЕТОДИКА. Культура клеток линии FL была приобретена в научно-исследовательском центре предприятия “Диалек” (Минск, Беларусь). Клетки линии FL культивировали на среде MEM (“Sigma”, США) с добавлением 8-10% телячьей сыворотки. Клетки выращивали в пластиковых сосудах в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Измерения внутриклеточной концентрации H₂O₂ проводили в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР), содержащем: 131 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂, 1,3 мМ MgSO₄, 0,4 мМ KH₂PO₄, 20 мМ Hepes, 6 мМ глюкозу, pH 7,4. В качестве индикатора изменений [H₂O₂]_{in} использовали H₂DCF-DA “Sigma”. Суспензию клеток в СБСР нагружали H₂DCF-DA в течение 20 минут при температуре 37°C. Концентрация H₂DCF-DA во внеклеточном растворе составляла 0,05 мМ. После этого клетки дважды отмывали в СБСР. Суспензию клеток разделяли на равные пробы (1×10⁶ клеток/мл) и хранили при комнатной температуре (не более одного часа).

Измерения флуоресценции проводили с использованием спектрофлуориметра LSF 1211A научно-производственного центра “СОЛАР” (Минск, Беларусь). Длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны флуоресценции – 530 нм.

Все полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При инкубации клеток амниона человека линии FL с внеклеточным H₂O₂ наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF. Интенсивность флуоресценции DCF зависела от внеклеточной концентрации H₂O₂ (в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мМ) и времени экспозиции.

Интенсивность флуоресценции DCF увеличивается со временем вследствие следующей реакции:



Скорость образования DCF зависит от концентрации H₂DCF и H₂O₂:

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = k \times [\text{H}_2\text{DCF}]_{\text{in}} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}} \quad (2),$$

где k – константа скорости реакции. Скорость реакции между H₂DCF и H₂O₂ значительно ниже, чем с другими внутриклеточными окислителями (гидроксильным радикалом, оксидом азота и пероксинитритом) [20]. При используемых концентрациях H₂DCF и H₂O₂ внутриклеточная концентрация

H_2DCF с течением времени изменяется незначительно. Поэтому, можно допустить, что: в условиях эксперимента

$$\frac{d[DCF]}{dt} \sim [H_2O_2]_{in} \quad (3).$$

Окисление внутриклеточного H_2DCF происходит значительно медленнее, чем окисление H_2DCF пероксидом водорода в СБСР. На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции DCF при окислении H_2O_2 в СБСР (1) и внутри клеток (2). Поскольку увеличение скорости окисления внутриклеточного H_2DCF не наблюдалось, мы предположили, что концентрации образующихся вторичных радикалов (гидроперекисей, гидроксильного радикала и др.) значительно меньше, чем концентрация H_2O_2 , вошедшего в клетку. Поэтому их вклад в изменение интенсивности флуоресценции можно не учитывать. Наблюдаемые отличия в скоростях окисления H_2DCF свидетельствуют об утилизации H_2O_2 внутриклеточными компонентами. Для нахождения кинетических характеристик процесса утилизации пероксида водорода клеточными антиоксидантами, необходимо анализировать скорость образования DCF или скорость изменения флуоресценции DCF, т.е.:

$$\frac{dI}{dt} = k_p \cdot [H_2O_2]_{in} \quad (4),$$

где k_p – определяемая экспериментально константа.

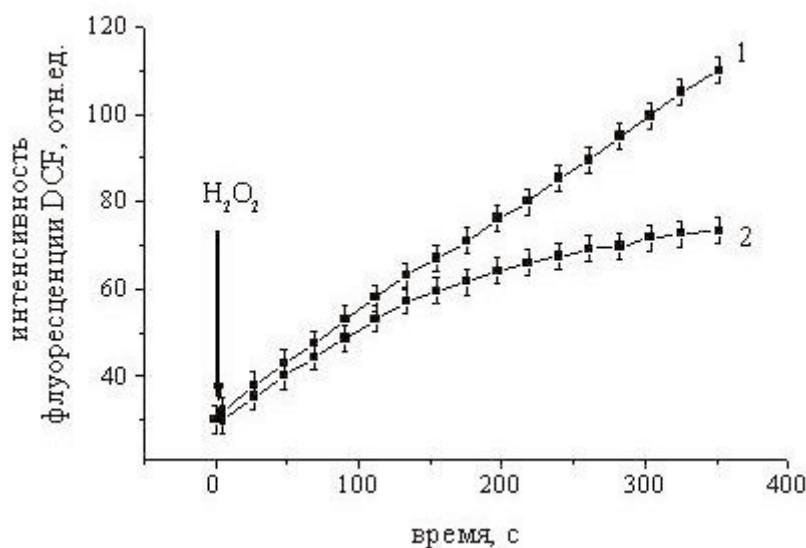


Рисунок 1.

Зависимости интенсивности флуоресценции DCF при окислении пероксидом водорода в СБСР (1) и внутри клеток (2). Концентрация внеклеточного H_2O_2 – 1 мМ. Концентрация клеток линии FL – 1×10^6 клеток в 1 мл СБСР.

Согласно уравнению (4), скорость изменения флуоресценции DCF характеризует изменение величины внутриклеточной концентрации H_2O_2 в течении времени инкубирования клеток в СБСР, содержащем пероксид водорода. В литературе также есть данные о том, что зависимость скорости интенсивности флуоресценция DCF от концентрации пероксида водорода линейна в диапазоне концентраций 0,1–1 мМ [21]. Используя уравнение (4) и зависимость скорости изменения интенсивности флуоресценции DCF от концентрации H_2O_2 , полученную экспериментально, легко определить коэффициент k_p , который

УТИЛИЗАЦИЯ H_2O_2 ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

связывает скорость интенсивности флуоресценции и концентрацию пероксида водорода и равен $k_p = 0,25 \pm 0,01$ (л)/(с·ммоль). Таким образом, путем дифференцирования зависимостей, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции DCF от времени, можно получить количественные зависимости изменения концентрации H_2O_2 от времени инкубирования. На рисунке 2 представлены зависимости внеклеточной и внутриклеточной концентрации H_2O_2 от времени инкубирования клеток.

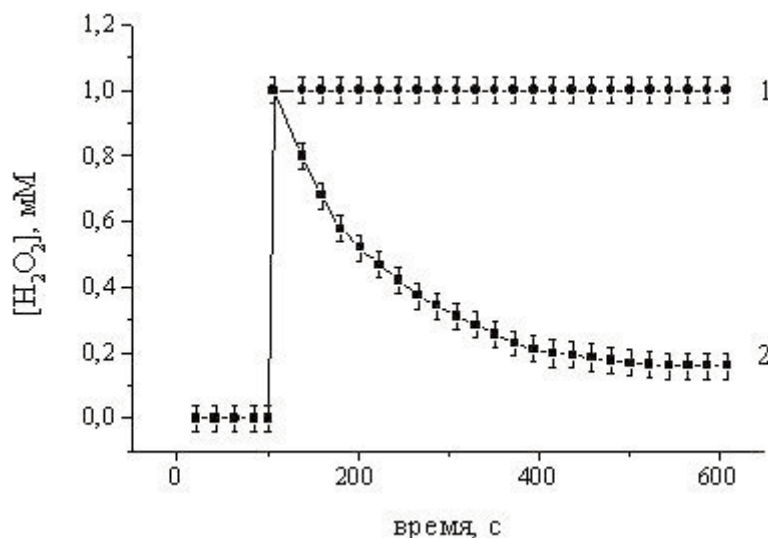


Рисунок 2.

Зависимости концентрации пероксида водорода в СБСР (1) и внутри клеток (2). Концентрация внеклеточного H_2O_2 – 1 мМ. Концентрация клеток линии FL – 1×10^6 клеток в 1 мл СБСР.

Для нахождения констант, характеризующих диффузию пероксида водорода в клетки и процессы утилизации внутриклеточными антиокислительными системами в эпителиальных клетках амниона человека линии FL, построили следующую математическую модель. В основе этой модели лежит предположение о том, что скорость изменения внутриклеточной концентрации $[H_2O_2]_{in}(t)$ будет определяться разностью между скоростью поступления H_2O_2 в клетку v_1 и скоростью утилизации H_2O_2 внутриклеточными компонентами v_2 :

$$v_1 = k_1 \times (c_0 - c(t)), \quad (5),$$

где $c_0 = [H_2O_2]_{out}$, $c(t) = [H_2O_2]_{in}(t)$, k_1 – коэффициент, характеризующий скорость диффузии H_2O_2 в клетку (числовые значения определяются для 10^6 клеток).

$$v_2 = k_2 \times c(t), \quad (6),$$

где k_2 – коэффициент, характеризующий скорость утилизации H_2O_2 внутри клеток (числовые значения определяются для 10^6 клеток).

Скорость изменения внутриклеточной концентрации пероксида водорода определяется следующим уравнением:

$$\frac{dc(t)}{dt} = v_1 - v_2 \quad (7).$$

Преобразуем (7) с учетом коэффициентов:

$$\frac{dc(t)}{dt} = k_1 \cdot c_0 - (k_1 + k_2) \cdot c(t) \quad (8).$$

Решением данного уравнения будет функция:

$$c(t) = c_0 \cdot \frac{k_1 + k_2 \cdot e^{-(k_1 + k_2)t}}{k_1 + k_2} \quad (9).$$

Выражение (9) можно упростить, если ввести понятие равновесного состояния для концентрации внутриклеточного пероксида водорода: $c(t) \rightarrow c_p$, при $t \rightarrow \infty$.

$$c_p = c_0 \cdot \frac{k_1}{k_1 + k_2} \quad (10).$$

Тогда (9) можно привести к следующему виду:

$$\frac{c(t) - c_p}{c_0 - c_p} = e^{-(k_1 + k_2)t} \quad (11).$$

При экспозиции клеток к 1 мМ H_2O_2 (c_0) значение внутриклеточной концентрации пероксида водорода в состоянии равновесия будет $c_p = 0,16$ мМ. С использованием выражения (10) можно определить отношение констант k_2/k_1 :

$$\frac{c_0 - c_p}{c_p} = \frac{k_2}{k_1} \quad (12).$$

На основании выражения (12) находим, что $k_2/k_1 = 6,25$. Для определения констант k_1 и k_2 необходимо построить логарифмическую анаморфозу для зависимости (9). Из выражения (11) получаем:

$$\ln \frac{c(t) - c_p}{c_0 - c_p} = -(k_1 + k_2) \cdot t \quad (13).$$

Зная значения тангенса угла наклона логарифмической анаморфозы для зависимости изменения величины внутриклеточной концентрации пероксида водорода от времени при экспозиции клеток к 1 ммоль/л H_2O_2 (рис. 3), определили сумму констант k_2 и k_1 ($k_2 + k_1 = 0,0095$). Зная сумму и отношение констант, легко получить значения констант $k_1 = 0,0015 \text{ с}^{-1}$ и $k_2 = 0,008 \text{ с}^{-1}$ для 10^6 клеток.

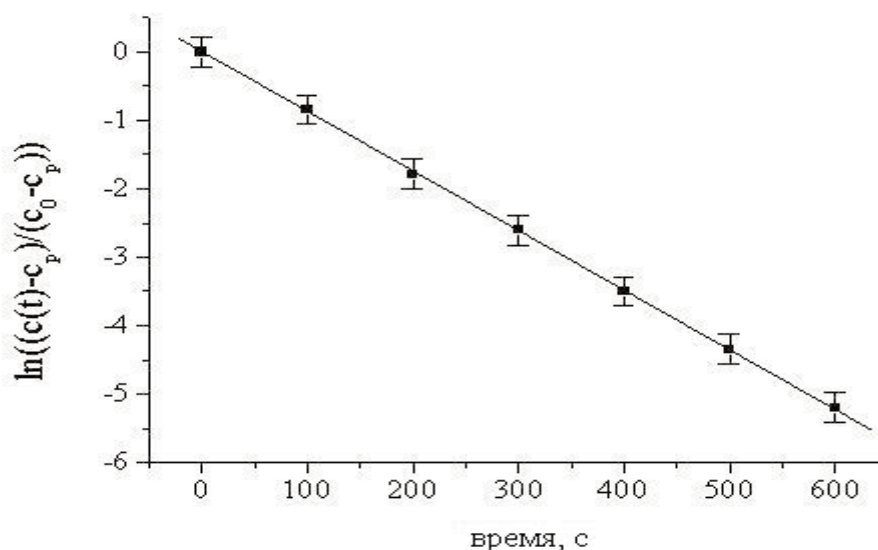


Рисунок 3.

Логарифмическая анаморфоза зависимости изменения величины внутриклеточной концентрации пероксида водорода от времени при экспозиции клеток к 1 мМ H_2O_2 .

Для характеристики процессов диффузии пероксида водорода через мембрану и его утилизации в отдельных клетках, пересчитали коэффициенты k_1 и k_2 на клеточный объем, используя следующие выражения [22]:

$$k_1^{\text{м}} = k_1 \cdot \frac{V_p}{V_{\text{м}} - N} \quad \text{и} \quad k_2^{\text{м}} = k_2 \cdot \frac{V_p}{V_{\text{м}} - N} \quad (14),$$

где N – число клеток (10^6 клеток), V_p – объем реакционной смеси (1 мл), $V_{\text{кл}}$ – объем клетки ($1,766 \times 10^{-15} \text{ м}^3$). В пересчете коэффициентов на клеточный объем получили значения $k_1^{\text{кл}} = 0,85 \text{ с}^{-1}$ и $k_2^{\text{кл}} = 4,53 \text{ с}^{-1}$.

Коэффициент $k_1^{\text{кл}}$, который определяется из экспериментальных данных, связан с коэффициентом проницаемости для пероксида водорода выражением:

$$P_i = k_1^{\text{м}} \cdot \frac{V_{\text{м}}}{S_{\text{м}}} \quad (15).$$

Для клеток радиусом $7,5 \times 10^{-6} \text{ м}$ значение коэффициента проницаемости согласно выражению (15) будет равно $P_i = (2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$.

Коэффициент $k_2^{\text{кл}}$ представляет суммарную характеристику внутриклеточных компонентов, утилизирующих пероксид водорода, среди которых ферменты каталазы (Cat) и пероксидазы (Px), восстанавливающие агенты глутатион (GSH), тиоредоксин, мочева и аскорбиновая кислота и д.р., т.е.:

$$k_2^{\text{м}} = k_{\text{Cat}} \cdot [\text{Cat}]_i + k_{\text{Px}} \cdot [\text{Px}]_i + k_{\text{GSH}} \cdot [\text{GSH}]_i + \dots \quad (16),$$

где k_{Cat} – константа скорости реакции утилизации пероксида водорода каталазой, $[\text{Cat}]_i$ – внутриклеточная концентрация каталазы, k_{Px} – константа скорости реакции утилизации пероксида водорода глутатион пероксидазой, $[\text{Px}]_i$ – внутриклеточная концентрация глутатионпероксидазы, k_{GSH} – константа скорости реакции между пероксидом водорода и глутатионом, $[\text{GSH}]_i$ – внутриклеточная концентрация глутатиона. Коэффициент $k_2^{\text{кл}}$ можно рассматривать как псевдо-константу скорости первого порядка для утилизации пероксида водорода внутриклеточными антиоксидантными компонентами.

Используя значения коэффициента $k_2^{\text{кл}}$, можно оценить клеточную проницаемость для пероксида водорода на основе способа предложенного в работе [22]:

$$P_i = \frac{k_2^{\text{м}} \cdot G}{\frac{S_{\text{м}}}{V_{\text{м}}} (1 - G)} \quad (17),$$

где $S_{\text{кл}}$ – площадь клеточной мембраны, $V_{\text{кл}}$ – внутриклеточный объем, $k_2^{\text{кл}}$ – псевдо-константа скорости первого порядка для утилизации H_2O_2 , $G = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}} / [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{out}} = 0,16$. Для клеток радиусом $7,5 \times 10^{-6} \text{ м}$ значение коэффициента проницаемости, согласно выражению (17), будет равно $P_i = (2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$.

Значение коэффициента проницаемости H_2O_2 через плазматическую мембрану для клеток линии FL, определенное в результате исследования, оказалось ниже, чем значение коэффициента проницаемости для эритроцитов ($P_i = 6 \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$) и клеток *Escherichia coli* ($P_i = 1,6 \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$) [23], но близкое по значению к коэффициенту проницаемости H_2O_2 для Т-клеток ($P_i = 3 \times 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$) [22]. Возможно, имеющийся в литературе разброс данных для P_i связан с учетом размеров клеток.

На основании модельного рассмотрения, используемого в работе, можно определить изменение концентрации внутриклеточного H_2O_2 с течением времени. Теоретические зависимости, полученные в соответствии с уравнением (9), хорошо коррелируют с экспериментальными данными, полученными для клеток линии FL.

На рисунке 4 представлены зависимости внутриклеточной концентрации пероксида водорода от времени для 1 мМ H_2O_2 (1) и 0,5 мМ H_2O_2 (2), полученные в эксперименте и в результате моделирования (непрерывная линия).

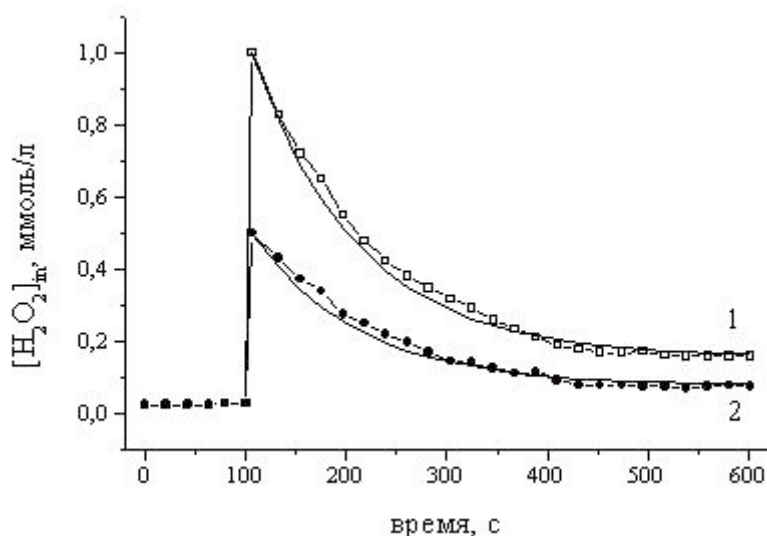


Рисунок 4.

Зависимости внутриклеточной концентрации пероксида водорода от времени при инкубировании клеток с 1 мМ H_2O_2 (1) и 0,5 мМ H_2O_2 (2), полученные в эксперименте (линия с точками) и в результате моделирования (непрерывная линия)

Полученные данные свидетельствуют о том, что при инкубировании клеток с H_2O_2 через плазматическую мембрану устанавливается разность концентраций пероксида водорода, величина которой определяется скоростью диффузии H_2O_2 в клетки и скоростью утилизации внутриклеточного H_2O_2 антиокислительными системами.

Активность внутриклеточных антиокислительных систем зависит от типа клетки и действия многих клеточных регуляторов. Экспериментальные и теоретические подходы, используемые в работе, позволяют количественно охарактеризовать активность внутриклеточных антиокислительных систем при сравнительном анализе различных типов клеток с учетом типа и числа клеток, используемых в экспериментах.

Данные подходы, позволяют оценить устанавливающийся уровень внутриклеточной концентрации пероксида водорода при инкубации клеток с различными концентрациями экзогенного пероксида водорода. Результаты исследований показывают, что флуоресцентный зонд H_2DCF может быть использован для мониторинга изменения редокс-состояния клетки при изучении различных клеточных процессов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Droge W. (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 47–95.
2. Ashok B.T., Ali R. (1999) *Exper. Gerontol.*, **34**, 293–303.
3. Beckman K., Ames B. (1998) *Phys. Rev.*, **78**, 547–581.
4. Fu S., Davies M., Stocker R., Dean R. (1998) *Biochem. J.*, **333**, 519–525.
5. Duranteau J., Chandel N., Kulisz A., Shao Z., Schumacker P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11619–11624.
6. Mates J., Perez-Gomez C., Nunez De Castro I. (1999) *Clin. Biochem.*, **32**, 595–603.
7. Berlett B.S., Stadtman E.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313–20316.

УТИЛИЗАЦИЯ H_2O_2 ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

8. Cohen G., Farooqui R., Kesler N. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 4890-4894.
9. Melino G., Savini I., Guerrieri P., Finazzi-Agro A. (1990) Free Radic. Res. Commun., **11**, 213-221.
10. Regoli F., Winston G.W. (1999) Toxicol. Appl. Pharmacol., **156**, 96-105.
11. Royall J.A., Ischiropoulos H. (1993) Arch. Biochem. Biophys., **302**, 348-355.
12. Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. (1994) Brain Res., **635**, 113-117.
13. Takanashi T., Ogura Y., Taguchi H., Hashizoe M., Honda Y. (1997) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **13**, 2721-2728.
14. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. (1992) Chem. Res. Toxicol., **5**, 227-231.
15. Swift L.M., Sarvazyan N. (2000) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **278**, H982-H990.
16. Ubezio P., Civoli F. (1994) Free Radic. Biol. Med., **16**, 509-516.
17. Taguchi H., Ogura Y., Takanashi T., Hashizoe M., Honda Y. (1996) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **37**, 1444-1450.
18. Jakubowski W., Bartosz G. (2000) Cell Biol. Int., **24**, 757-760.
19. Mayer D., Muhlhofer A., Biesalski H.K. (2001) Eur. J. Med. Res., **6**, 201-208.
20. Possel H., Noacka H., Augustin W., Keilhoff G., Wolf G. (1997) FEBS Lett., **416**, 175-178.
21. Wang H., Joseph J.A. (1999) Free Radic. Biol. Med., **27**, 612-616.
22. Antunes F., Cadenas E. (2000) FEBS Lett., **475**, 121-126.
23. Seaver L., Imlay J. (2001) J. Bacteriol., **183**, 7182-7189.

Поступила: 18. 08. 2003

CONSUMPTION OF INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE IN EPITHELIAL HUMAN AMNION CELLS

GG. Martinovich, S.N. Cherenkevich

Belarus State University; Pr. F. Scoryny, 4, Minsk, 220050 Belarus;
tel.: 226-58-36; fax: 209-54-45; e-mail: MartinovichGG@bsu.by

The method for determination of intracellular oxidants content has been proposed. The method is based on the analysis of changes of 2,7-dichlorodihydrofluorescein oxidation. The theoretical model of hydrogen peroxide diffusion and its consumption in the cell and quantitative determination of hydrogen peroxide gradient through the cellular membrane has been built taking into account the experimental data. The coefficient for H_2O_2 permeability through the plasma membrane of human amnion cells is $(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Key words: hydrogen peroxide, 2,7-dichlorodihydrofluorescein, oxidative stress, redox regulation, permeability coefficient, fluorescent analysis.