

Н.Я. Гильяно<sup>1</sup>, С.И. Степанов<sup>1</sup>, Л.А. Носкин<sup>1</sup>, Е.Н. Архипова<sup>2</sup>, Л.В. Коневега<sup>1</sup>

## **Исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета амилоида**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, 188300, Гатчина, Ленинградская область, Орлова Роща 1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

На клетках нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12) в культуре исследованы механизмы, определяющие цитотоксический эффект окислительного стресса и роль амилоидов в усилении последнего. Сравнительная флуориметрическая оценка цитотоксичности перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и фрагмента бета амилоидного (A $\beta$ ) пептида 25-35 показала дозо-зависимое увеличение доли клеток с содержанием ДНК меньше 2с. Изоэффективными были концентрации 1мМ  $H_2O_2$  и 5 мкМ A $\beta$ . Цитотоксический эффект сопровождался увеличением внутриклеточного уровня супероксида ( $O_2^-$ ). Обработка клеток донором оксида азота нитрозоглютаатином (GSNO) и хелатором ионов железа о-фенантролином существенно снижала как внутриклеточный уровень  $O_2^-$  так и цитотоксический эффект, индуцированные  $H_2O_2$  и A $\beta$  25-35. Таким образом, в прямом эксперименте показана роль амилоидов в усилении окислительного стресса и участие активных кислородных радикалов в цитотоксическом эффекте A $\beta$ . Дополнительным аргументом, подтверждающим вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов, является аналогичность реакции клеток на действие окислительного агента —  $H_2O_2$  и A $\beta$ .

**Ключевые слова:** PC 12, A $\beta$  амилоид  $\beta$ ,  $H_2O_2$ , супероксид  $O_2^-$ , апоптоз, цитометрия

N.Ya. Giliano<sup>1</sup>, S.I. Stepanov<sup>1</sup>, L.A. Noskin<sup>1</sup>, E.N. Arkhipova<sup>2</sup>, L.V. Konevega<sup>1</sup>

## **Assessing of the role superoxide, nitric oxide and redox metals in cytotoxic effect of the $H_2O_2$ and amyloid- $\beta$ -protein**

<sup>1</sup> B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, 1, Orlova Roscha, Gatchina, Leningrad region, 188300 Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

On the cells of neuroendocrine tumor of rats (line PC12) in culture was estimating of the governing mechanisms of the cytotoxicity of the oxidative stress and the role of the amyloids in increasing this stress. Using flowcytometric assessment of the cytotoxicity  $H_2O_2$  and fragment  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptide (25-35) has been shown the dose-dependent increasing of the quote of the cells with DNA content <2с. Isoeffective concentrations were 1 мМ  $H_2O_2$  and 5 мкМ A $\beta$ . The cytotoxicity  $H_2O_2$  and A $\beta$  were accompanig with the increasing of the intracellular level of  $O_2^-$ . The treatment of the cells GSNO (donor of NO) and o-phenantrolin (chelators of Fe ions) significantly decreased the intracellular level of  $O_2^-$  as well as the cytotoxicity  $H_2O_2$  and A $\beta$ . Thus, in direct experiments has been shown of the part amyloids in the increasing of the oxidative stress and participation of the reactive oxide radicals in the cytotoxic effect of the A $\beta$ . The addition argument which confirmed contribution of the oxidative stress in the cytotoxic effect of the A $\beta$  was the similarity of the cellular response on the action of the oxidative agent —  $H_2O_2$  and A $\beta$ .

**Key words:** PC 12, A $\beta$  amyloid  $\beta$ ,  $H_2O_2$ , superoxide  $O_2^-$ , apoptosis, cytometry

Показано, что дисфункция митохондрий и окислительный стресс играют важную роль в ранней патологии нейродегенеративных заболеваний [2, 3, 4, 10, 13, 14]. Окислительные повреждения предшествуют формированию бета амилоидных (A $\beta$ ) бляшек, являющихся одной

из патологических особенностей головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [11, 10]. Предполагается, что реактивные кислородные и азотистые радикалы модифицируют белки либо прямо взаимодействуя с ними, либо через продукты перекисного окисления липидов. Окисленные модифицированные липиды ускоряют олигомеризацию A $\beta$  [6]. Олигомеризация A $\beta$  ассоциируется с поздней стадией развития заболевания, которая характеризуется выраженным апоптозом нейронов, массивной,

**Для корреспонденции:** Гильяно Надежда Яковлевна, д-р биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. медицинской биофизики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова. E-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

прогрессирующей потерей различных популяций нейронов. При этом следует подчеркнуть, что агрегация бета-амилоидного белка не является причиной наиболее распространенной спорадической формы болезни Альцгеймера, а является лишь следствием протекания других патологических процессов, таких как окислительный стресс и воспаление. Возможно, что сам Аβ способен продуцировать свободные радикалы через генерацию  $H_2O_2$ . Кроме того, показано увеличение экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) после обработки клеток Аβ [9]. Механизмы, определяющие роль амилоидов в увеличении окислительного стресса, как и вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов до настоящего времени окончательно не определены. В последнее время точка зрения о токсичности Аβ пересматривается на основании результатов экспериментов, показавших, что в отсутствие редоксных ионов металлов Аβ не токсичен. Более того, авторы полагают, что агрегация бета-амилоидного белка и белка тау в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера является защитным компенсаторным процессом, направленным на восстановление функциональной активности нейронов [5, 6]. Предполагается, что определяющим фактором в развитии нейродегенеративных заболеваний является истощение антиоксидантной системы (в частности, низкий уровень глутатиона в клетках) и повышенная концентрация металлов переменной валентности [16].

**Цель работы** — выявление цитотоксичности олигомеризованного фрагмента (25-35) бета амилоида и условий, модифицирующих эффект такого олигомера. Проведено сравнительное исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте  $H_2O_2$  и Аβ на клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12) в культуре.

### Методика

Клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линии PC 12) часто используются в качестве модельной системы при исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона. Показано, что PC12 синтезируют, сохраняют и секретируют допамин и ацетилхолин [12]. Клетки культивировали во флаконах Карреля на питательной среде Игла с добавлением 10% сыворотки эмбриона телёнка. В качестве антибиотика при инкубации клеток в этой среде использовали гентамицин.

В качестве индуктора окислительного стресса использовали  $H_2O_2$  — реагент широко используемый в моделях *in vitro*. Показано, что в концентрациях от 0,1 до 5 мМ, он существенно снижал жизнеспособность клеток данной клеточной линии [17].

Аβ пептидный фрагмент 25-35, выдержанный 2 дня при 37°C, был любезно предоставлен В. Захаровым (лаб.биополимеров ПИЯФ, НИЦ «Курчатовский институт»). Показано, что инъекция данного

фрагмента бета-амилоидного пептида индуцирует симптомы болезни Альцгеймера у крыс [2].

Для оценки роли ионов металлов переменной валентности в питательную среду вводили водорастворимый хелатор железа — о-фенантролин (в концентрации 50 мкМ). Ранее нами было показано, что данная концентрация снижала апоптотическую гибель клеток HeLa [7].

В качестве модификатора баланса свободных радикалов использовали донор оксида азота нитрозоглутатион (GS-NO). Ранее нами было показано, что добавление 0,5 мМ GS-NO к клеткам HeLa при их инкубации в питательной среде в течение 22 ч приводило к увеличению внутриклеточной концентрации NO как минимум в 6 раз по сравнению с контро-

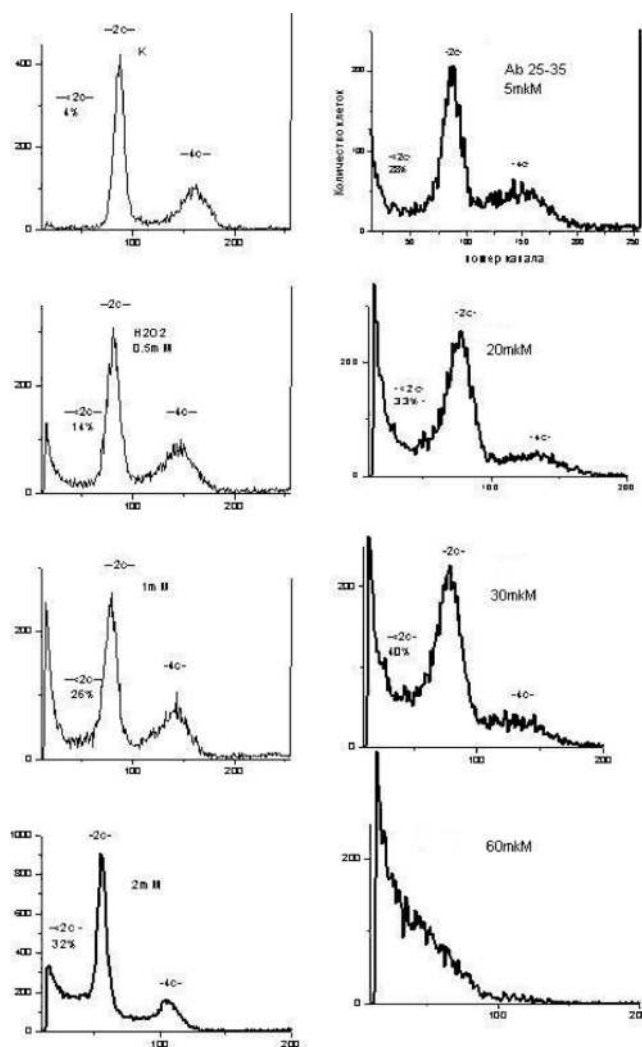


Рис. 1. Влияние различных концентраций  $H_2O_2$  (левая панель) и Аβ (25-35) (правая панель) на апоптотическую гибель клеток PC 12. Оценивалось распределение клеток по содержанию ДНК после окрашивания их бромистым этидием. По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — число клеток в отн.ед.

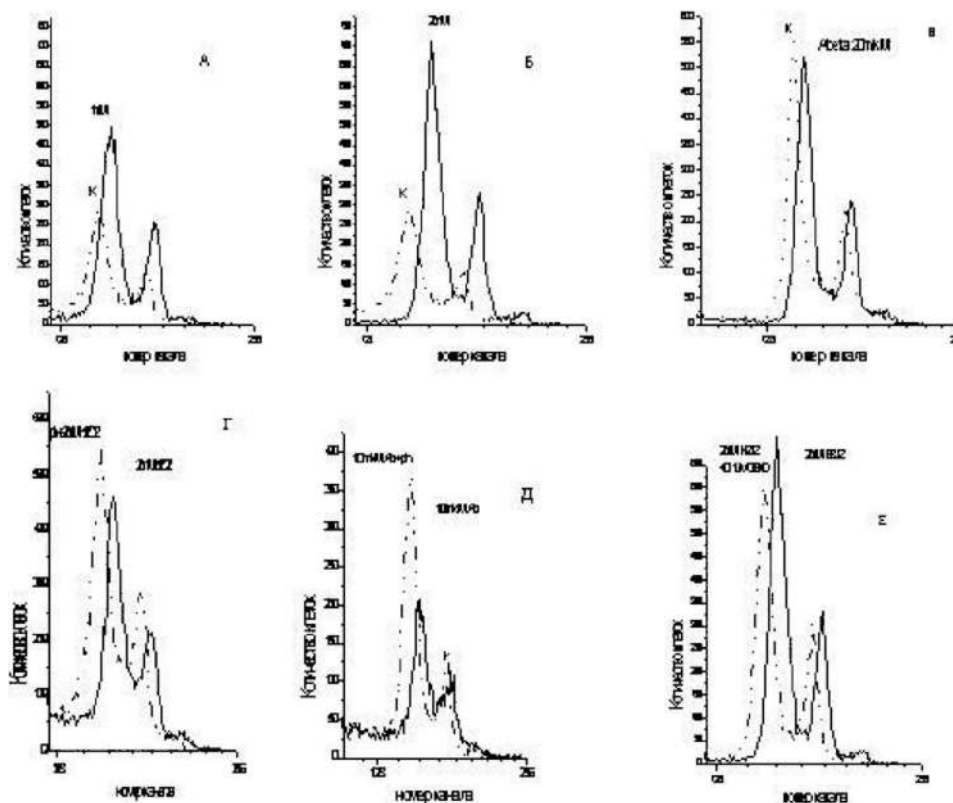


Рис. 2. Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а и б, сплошная линия —  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — контроль) и  $\text{A}\beta$  (25-35) (в — сплошная линия 20 мкМ  $\text{A}\beta$ ; пунктирная — контроль) на внутриклеточный уровень супероксида и его модификация хелатором железа — о-фенантролином (г — сплошная линия  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — фенантролин +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; д — сплошная линия — 10 мкМ  $\text{A}\beta$ ; пунктирная — фенантролин + 10 мкМ  $\text{A}\beta$ ) и GSNO (е — сплошная линия —  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — GSNO +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). По оси абсцисс — номер канала флуоресценции (масштаб полулогарифмический  $\log_2$ ); по оси ординат — число клеток в отн.ед.

лем. При концентрации GS-NO от 0,5 мМ и выше регистрировали апоптотическую гибель клеток HeLa [7]. В данном исследовании мы использовали концентрацию GS-NO 0.1 мМ, не индуцирующую апоптотическую гибель клеток.

Для детекции внутриклеточного  $\text{O}_2^-$  использовали дигидроэтидин (DHE) (фирма «Sigma»). Клеточная суспензия инкубировалась в темноте с реактивом в конечной концентрации 5 мкМ в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ , а затем анализировалась на проточном цитометре.

Цитотоксичность  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{A}\beta$  оценивали по появлению субпопуляции клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного набора ( $<2c$ ) при цитометрическом анализе распределения клеток по содержанию ДНК при окрашивании клеточной суспензии бромистым этидием [1].

Цитофлуориметрический анализ клеточной суспензии проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины Петербургского Института ядерной физики. В каждой пробе анализировали не менее 20 тыс. клеток. Регистрация флуоресценции проводилась в полулогарифмическом ( $\log_2$ ) масштабе при регистрации внутриклеточного

уровня  $\text{O}_2^-$ , и в линейном масштабе при анализе распределения клеток по содержанию ДНК [1].

### Результаты и обсуждение

Результаты одного из пяти независимых экспериментов по исследованию цитотоксичности различных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{A}\beta$  представлены на рис. 1 в виде гистограмм, характеризующих распределение клеток по содержанию ДНК. Из гистограмм видно дозозависимое увеличение доли клеток с содержанием ДНК меньше  $2c$  после 22-часовой обработки клеток как  $\text{H}_2\text{O}_2$  (левая панель), так и  $\text{A}\beta$  25-35 (правая панель). Изоэффективными были концентрации 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 5 мкМ  $\text{A}\beta$ . При концентрациях 50—60 мкМ  $\text{A}\beta$  и 15—20 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (данные не приводятся) мы регистрировали почти полный развал клеток, что согласуется с результатами других исследователей [10].

Параллельно с цитотоксичностью определяли внутриклеточный уровень супероксида, индуцированный 2-часовой обработкой клеток либо  $\text{H}_2\text{O}_2$ , либо  $\text{A}\beta$  25-35 и затем инкубированных с флуоресцентным индикатором  $\text{O}_2^-$  — дигидроэтидием. Из гистограмм, представленных на рис. 2, видно, что обработка клеток

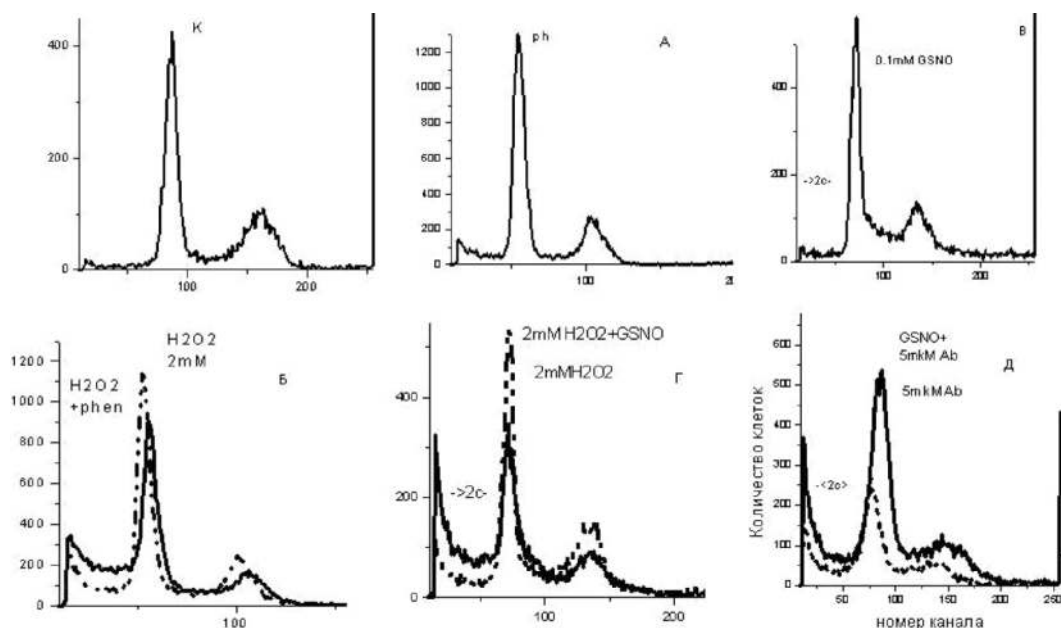


Рис. 3. Влияние о-фенантролина (А) и GSNO (В) на апоптотическую гибель клеток PC12 (верхняя панель) и апоптоз, индуцированный  $H_2O_2$  (Б, Г сплошная линия — 2 мМ  $H_2O_2$ , пунктирная линия — Б-фенантролин +  $H_2O_2$ , Г — GSNO +  $H_2O_2$ ) и Аβ (25-35) (Д, сплошная линия 5 мкМ Ab, пунктирная — GSNO + 5 мкМ Ab). По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — число клеток в отн.ед.

$H_2O_2$  приводила к увеличению интенсивности флуоресценции клеток, что соответствовало увеличению внутриклеточного уровня супероксида. Как и при оценке апоптотической гибели клеток, наблюдается зависимость от концентрации  $H_2O_2$  (рис. 2а, б).

Увеличение интенсивности флуоресценции клеток регистрировали и после обработки клеток Аβ 25-35 (рис. 2в). Генерация свободных радикалов тонко связана с участием редокс активных металлов. Редоксное состояние клетки в значительной степени связано с ионами железа (меди) и поддерживается в строгих физиологических границах. Известно, что для дисмутации  $H_2O_2$  необходимо присутствие ионов металлов переменной валентности. Мы сравнили изменение внутриклеточного уровня  $O_2^-$ , индуцированное 2 мМ  $H_2O_2$  (рис. 2г) и 10 мкМ Аβ 25-35 (рис. 2д) без хелатора ионов железа и с 50 мкМ хелатора железа — о-фенантролина. Как видно из гистограмм, обработка клеток о-фенантролином приводила к снижению интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных как с 2 мМ  $H_2O_2$ , так и с 10 мкМ Аβ 25-35. Продукты распада  $H_2O_2$ :  $O_2^-$  и  $OH^-$  радикалы являются продуктами нормального клеточного метаболизма и при физиологических концентрациях уравновешиваются активацией внутриклеточной антиоксидантной системой защиты клеток. При изменении внутриклеточного баланса свободных радикалов активацией или ингибированием внутриклеточных процессов, вовлеченных в генерацию свободных радикалов, меняется и клеточный ответ на различные неблагоприятные воздействия. Внутриклеточный редокс потенциал может быть фактором

определяющим, расти клетке или умирать. В качестве агента, меняющего внутриклеточный баланс свободных радикалов, был использован донор NO — GSNO, широко используемый в медицинской практике препарат. Обработка клеток 0,1 мМ GSNO приводила также к снижению внутриклеточного уровня  $O_2^-$  почти до контрольного значения (рис. 2е).

Ранее нами на клетках карциномы человека (HeLa G-63) было показано, что обработка клеток GSNO повышает внутриклеточный уровень NO и снижает внутриклеточный уровень  $O_2^-$ . NO, продуцируемый GSNO, ведет себя как антиоксидант [7]. Протективный эффект GSNO от нейротоксичности Аβ продемонстрирован в ряде работ [10, 15]. Мы провели сравнительное исследование модификации о-фенантролином и GSNO цитотоксического эффекта  $H_2O_2$  и Аβ 25-35. Из гистограмм на рис. 3 видно, что сам о-фенантролин в данной концентрации не проявлял цитотоксического эффекта (рис. 3а), но существенно снижал цитотоксический эффект  $H_2O_2$ .

Обработка клеток GSNO в концентрации 0,1 мМ не индуцировала клеточной гибели (рис. 3в), но существенно снижала цитотоксический эффект как  $H_2O_2$  (рис. 3г), так и Аβ 25-35 (рис. 3д). Снижение  $H_2O_2$ -индуцированной цитотоксичности GSNO свидетельствует о том, что  $O_2^-$  является одним из цитотоксических факторов. При этом известно, что  $O_2^-$  прямо не реагирует с полипептидами, сахарами или нуклеиновыми кислотами и его способность окислять липиды спорна. В процессе реакции  $O_2^-$  дисмутирует до  $H_2O_2$  и молекулярного кислорода.

$O_2^-$  следует рассматривать как первичный кислородный радикал, способный в дальнейшем взаимодействовать с другими молекулами и генерировать вторичные кислородные радикалы. Это может быть достигнуто или прямо, или через ферментативные или металл-катализируемые процессы. Цитопротективный эффект NO от  $H_2O_2$ -индуцированной цитотоксичности приписывается перехвату радикалов и восстановлению митохондриального дыхания. Показано также, что GSNO снижает нейротоксичность через ингибирование активации каспаз и реактивных кислородных радикалов [8, 15]. GSNO как стабилизатор и переносчик NO может проявлять протекторный эффект и за счет реакций транснаитрозилирования. Предполагается, что гомеостаз систем NO, GSNO, глутатиона и тиоредоксина является важным для защиты от окислительного стресса и апоптоза при нейродегенеративных заболеваниях. Полученные результаты также подтверждают точку зрения о взаимосвязи окислительного стресса с уровнем железа в клетках мозга, зарегистрированных при болезни Альцгеймера [9].

Таким образом, в прямом эксперименте показана роль бета-амилоидов (фрагмента 25-35) в увеличении окислительного стресса и участие активных кислородных радикалов (супероксида и  $H_2O_2$ ) в цитотоксическом эффекте Аβ. Дополнительным аргументом, подтверждающим вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов, является аналогичность реакции клеток на действие окислительного агента —  $H_2O_2$  и Аβ. При этом следует отметить, что нейродегенеративные заболевания это мультифакторные заболевания и причины гибели нейронов могут зависеть и от других факторов, но несомненно, что нарушения редоксного гомеостаза вносят свой существенный вклад в развитие данных заболеваний.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (12.04.00327а)

### Список литературы

1. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Носкин Л.А. Модификация внутриклеточного уровня свободных радикалов и апоптоз в эндотелиоцитах и клетках карциномы человека в культуре // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. — 2010. — Т. 150, №11. — С. 578-589.
2. Гуляева Н.В., Степанов М.Ю., Моисеева Ю.В. Изменения пролиферации клеток в субвентрикулярной зоне

мозга у взрослых крыс при введении бета-амилоидного пептида (25-35) // Нейрохимия. — 2002. — №3. — С. 165-175.

3. Almeida S., Sarmento-Ribeiro A.B., Januario C. et al. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients // Biochem & Biophysical Research Communications. — 2008. — Vol. 374. — P. 599-603.
4. Bisaglia M., Sarino M.E., Arduini I. et al. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease // Biochimica et Biophysica Acta. — 2010. — Vol. 1802. — P. 699-706.
5. Castellani R.J., Lee H.G., Perry G. et al. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau // Am. J. Alzheimers. Dis. Other Dement. — 2006. — Vol. 21, №2. — P. 126-130.
6. Castellani R.J., Lee H.G., Siedlak S.L. et al. Reexamining Alzheimer's disease: evidence for a protective role for amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta // J. Alzheimers Dis. — 2009. — Vol. 18, №2. — P. 447-452.
7. Giliano N.J., Konevega L.V., Noskin L.A. et al. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell cultures // Nitric Oxide. — 2011. — Vol. 24, №3. — P. 151-159.
8. Hung Y.H., Bush A., Cherny R.A. Copper in the brain and Alzheimer's disease // J. Biol. Inorg. Chem. — 2010. — Vol. 15. — P. 61-76.
9. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders // Mol. Cell Biochem. — 2010. — Vol. 345. — P. 91-104.
10. Ju T.C., Chen S.D., Liu C.C. et al. Protective effects of S-nitrosoglutathione against amyloid beta-peptide neurotoxicity // Free Radic. Biol. Med. — 2005. — Vol. 38, №7. — P. 938-949.
11. Kimura C., Oike M., Watanabe M. et al. Proapoptotic nitric oxide production in amyloid beta protein-treated cerebral microvascular endothelial cells // Microcirculation. — 2007. — Vol. 14, №2. — P. 89-97.
12. Melega W.P., Howard B.D. Choline and acetylcholine metabolism in PC12 secretory cells // Biochemistry. — 1981. — Vol. 20, №15. — P. 4477-4478.
13. Moreira P.I., Carvalho C., Zhu X. et al. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology // Biochimica et Biophysica Acta. — 2010. — Vol. 1802. — P. 2-10.
14. Pimplikar S.W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2009. — Vol. 41. — P. 1261-1268.
15. Rauhala P., Andoh T., Chiueh C.C. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2005. — Vol. 207 (2 Suppl.). — P. 91-95.
16. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. — 2005. — Vol. 11. — P. 1161-1208.
17. Zhang Shi-Ping, Du Xin-Gang, Pu Xiao-Ping. 3-O-demethylswertipunicoside protects against oxidative toxicity in PC12 cells // Biol. Pharm. Bull. — 2010. — Vol. 33, №9. — P. 1529-1533.

Поступила 14.05.13

### Сведения об авторах:

- Степанов Сергей Иванович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики, ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова  
 Носкин Леонид Алексеевич, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. медицинской биофизики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова  
 Архипова Елена Николаевна, и.о. старш. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Конева Леонид Владимирович, канд. биол. наук, старш. научн. сотр. лаб.молекулярной генетики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова