

Витамин K₃-индуцированное образование активных форм кислорода в клетках глиомы

Крылова Н.Г.

Научный руководитель **Кулагова Т.А.**

*Белорусский государственный университет,
физический факультет, кафедра биофизики, г. Минск*



- Активные формы кислорода (АФК) образуются в различных типах клеток и вовлечены во множество физиологических процессов, а также в инициацию и развитие ряда заболеваний.
- АФК образуются в небольшом количестве при нормальном функционировании клеток, что связано с утечкой электронов из электронтранспортной цепи митохондрий. АФК продуцируются в результате функционирования внутриклеточных ферментных систем, таких как NADPH-оксидазы, миелопероксидаза, ксантиноксидаза и цитохром- P_{450} -оксидаза.
- Существует ряд веществ, способных взаимодействовать с внутриклеточными ферментными системами, индуцируя образование АФК. Одними из представителей таких соединений являются хиноны.
- Многие противоопухолевые препараты по своему действию направлены на образование АФК, увеличение продукции которых активирует редокс-чувствительные белки, иницируя апоптоз.



К витаминам группы К относят филлохинон (витамин К₁), менахинон (витамин К₂) и менадион (витамин К₃).

Механизмы действия витамина К.

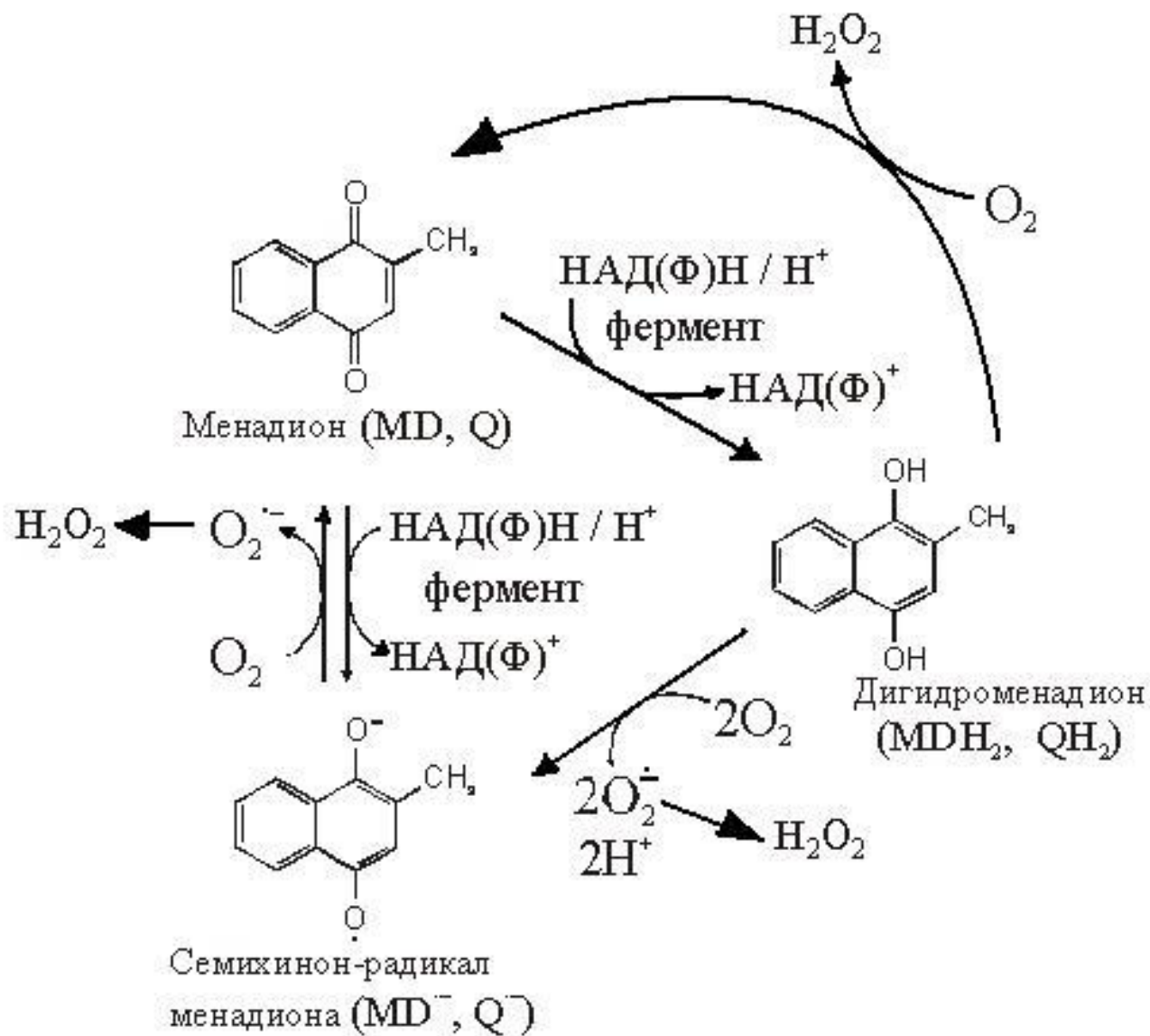
- Индуцирование окислительного стресса.
- Арилирование клеточных тиолов, что приводит к уменьшению концентрации глутатиона и ингибированию белков, содержащих SH-группы.
- Модификация активности тирозинкиназ и фосфотаз, что приводит к модуляции различных факторов транскрипции.

В результате этого индуцируется апоптоз. Причем при действии витаминов К₁ и К₂ эффект проявляется в гораздо меньшей степени, чем при применении менадиона.

Менадион используют в химиотерапии онкологических заболеваний, комбинируя его применение с витамином С.



Рис.1. Схема образования АФК при действии витамина К₃



Цель работы:

- Выявление механизмов образования АФК при действии витамина K_3 на клетки глиомы человека линии U251 и клетки глиомы крысы линии С6.



Методика эксперимента

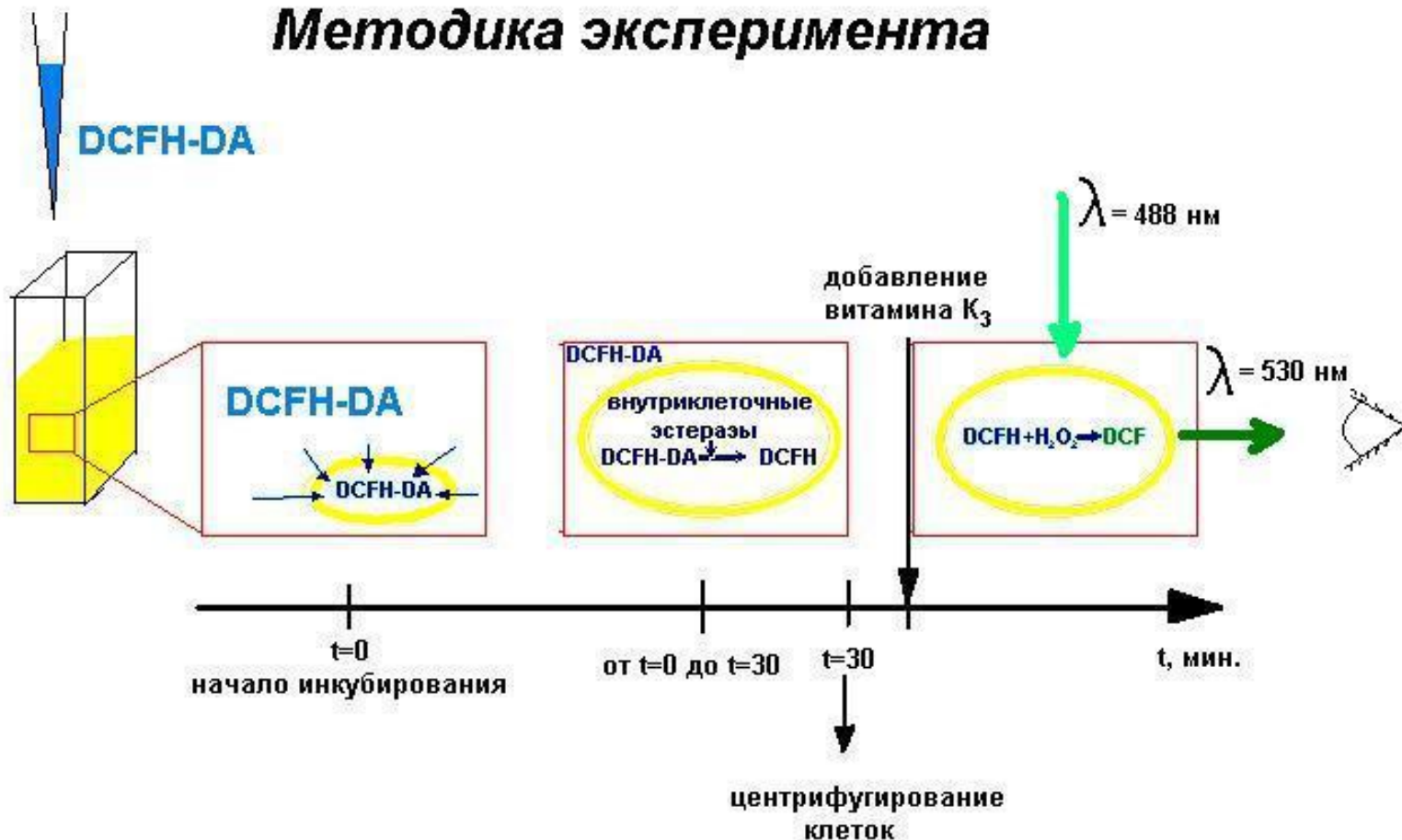


Рис.2. Изменение интенсивности флуоресценции 2,7-дихлорофлуоресцеина от времени при действии менадиона в различных концентрациях на клетки линии U251

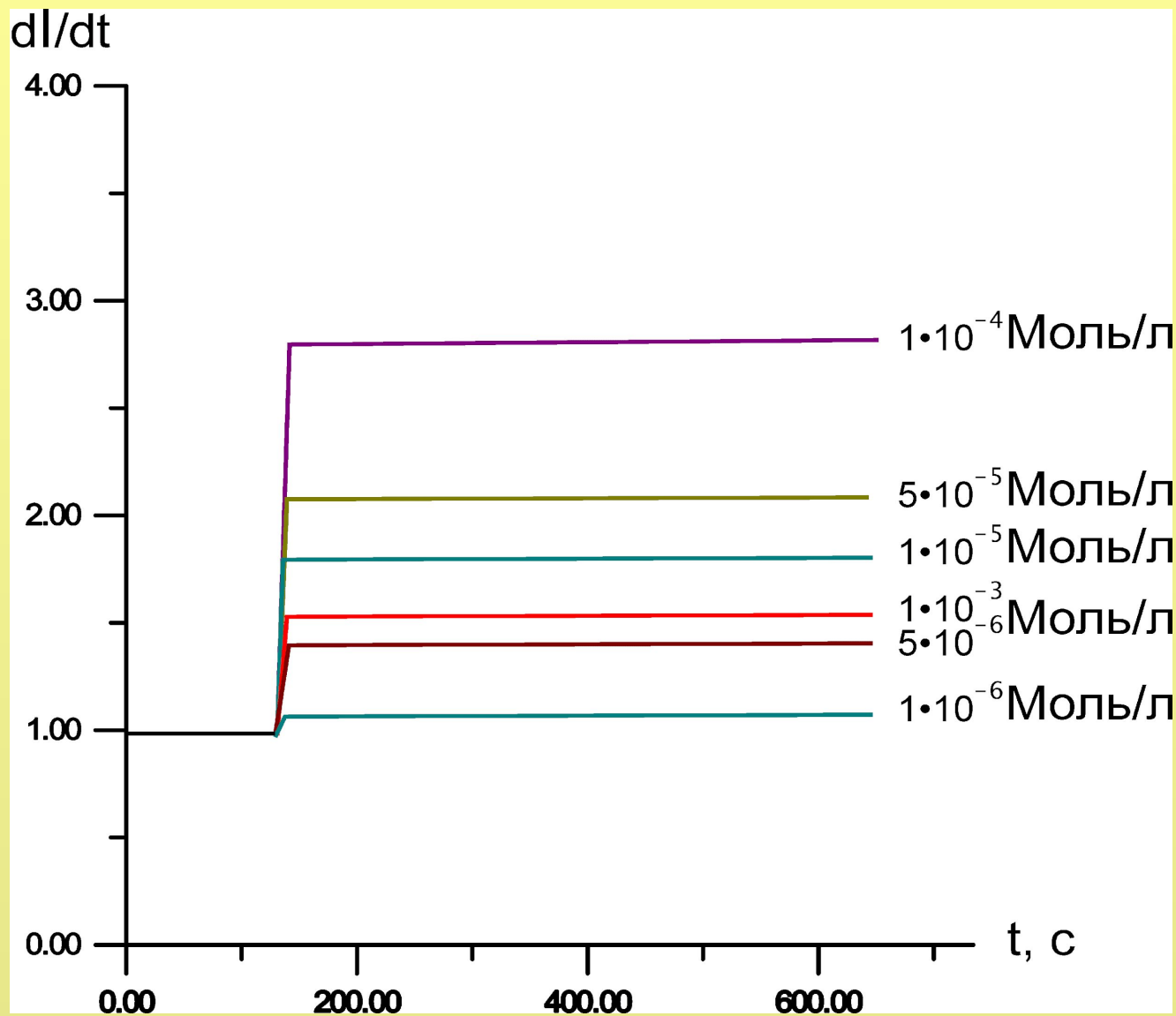


Рис.3. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции дихлорофлуоресцеина в клетках глиомы линии U 251 от концентрации менадиона

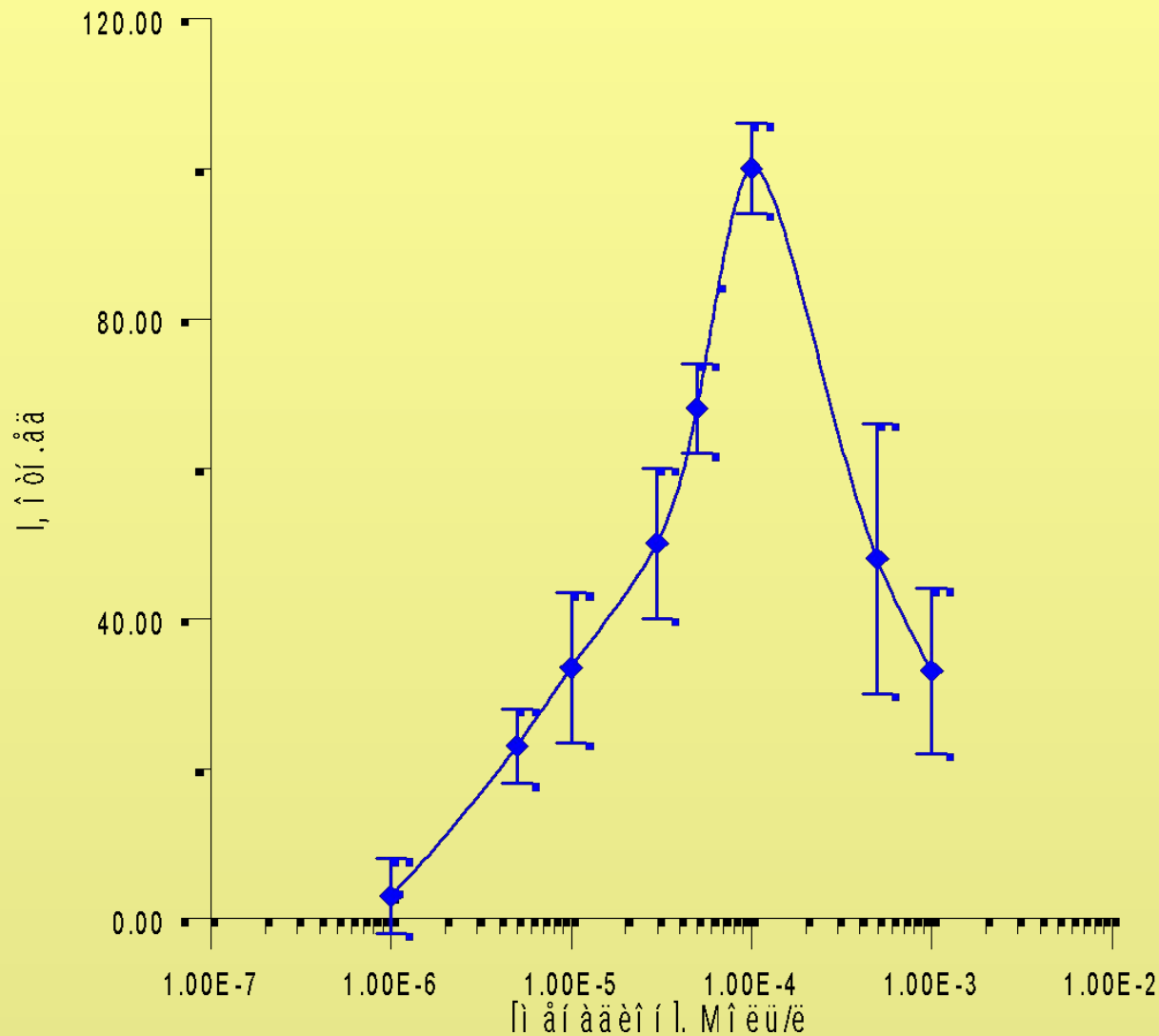


Рис.4. Изменение интенсивности флуоресценции 2,7-дихлорофлуоресцеина от времени при действии викасола в различных концентрациях на клетки линии U 251

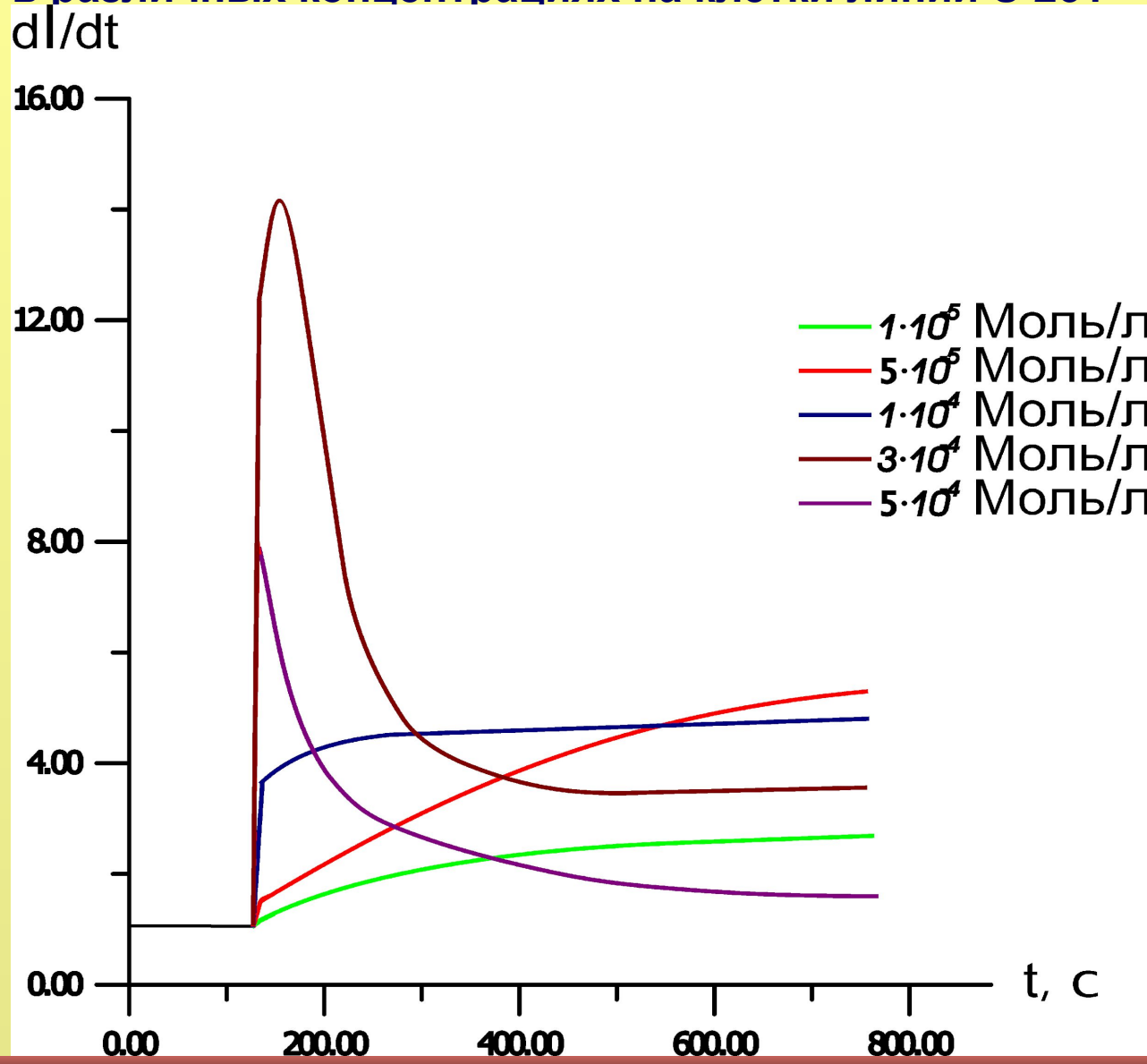


Рис.5. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции дихлорофлуоресцеина в клетках глиомы линии U251 от концентрации викасола

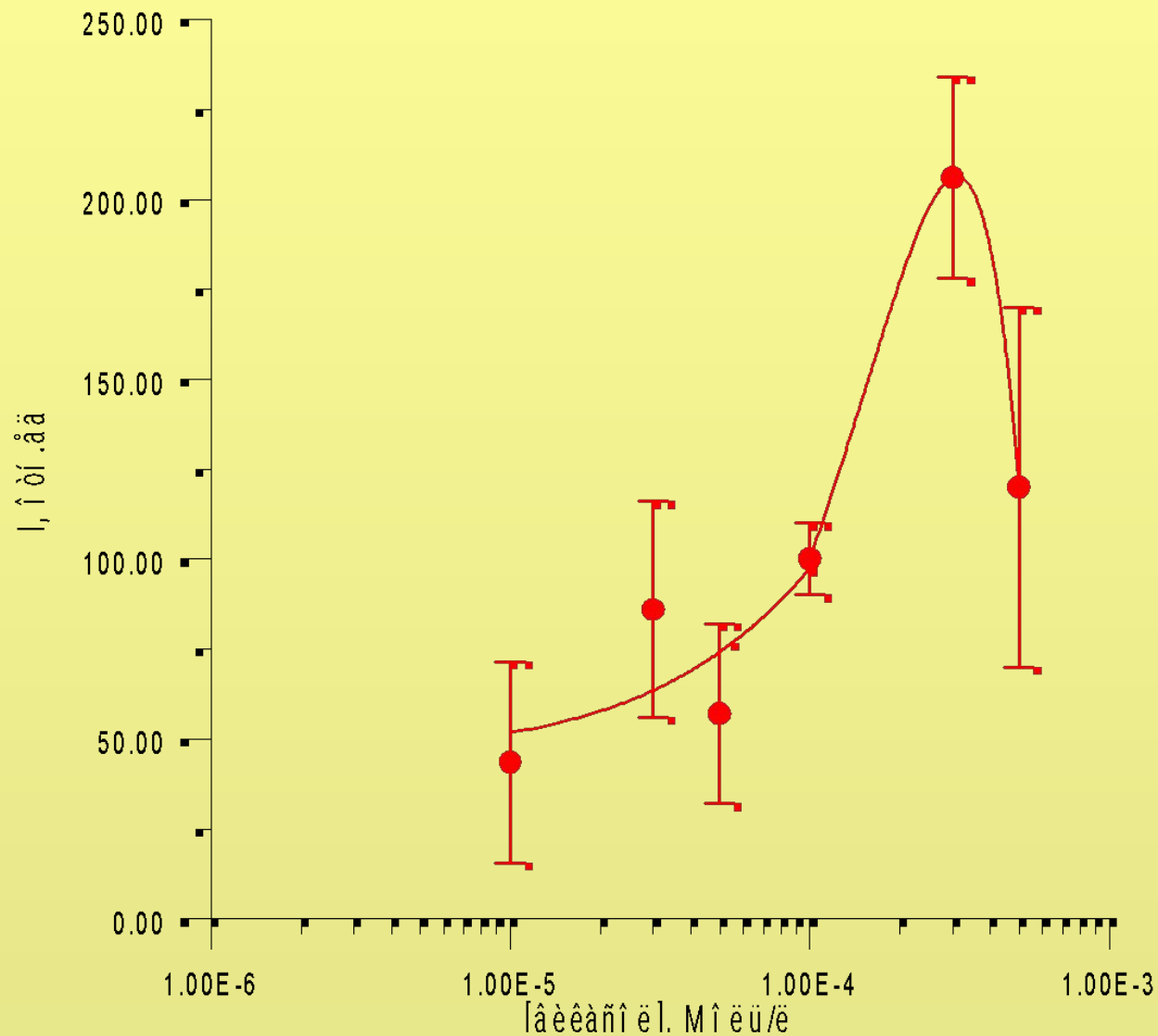
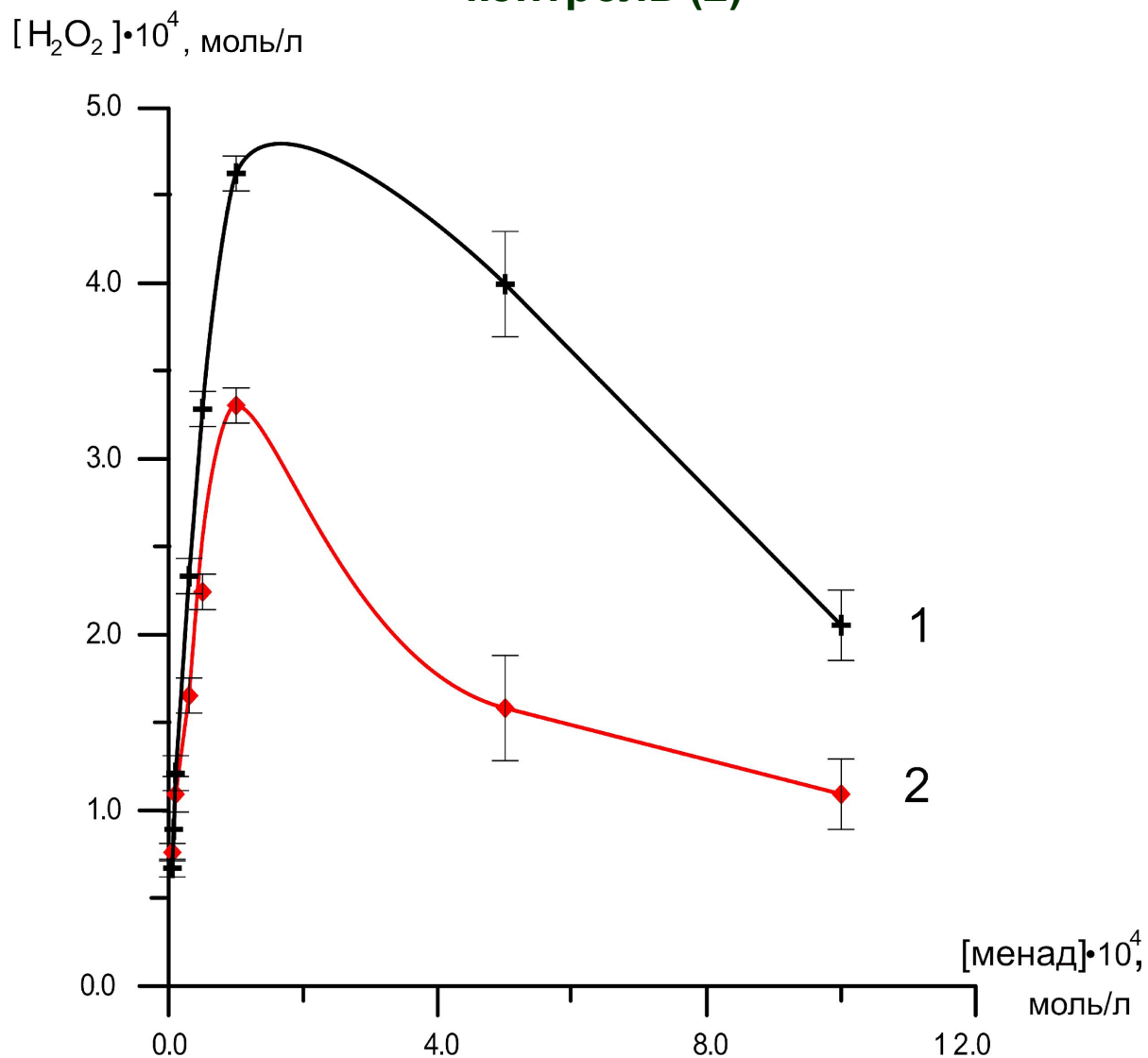


Рис.6. Зависимость концентрации образующегося пероксида водорода от концентрации добавленного менадиона в клетках линии U251 при инкубировании клеток с дикумаролом (1), контроль (2)



Теоретическая модель образования пероксида водорода при действии витамина K_3 с учетом только одноэлектронного восстановления хинона

$$\frac{dMD}{dt} = K_d(MD_0 - MD) - \frac{v_{E_1} MD}{k_{E_1} + MD + k \cdot MD^2} + k_4 MD^{\ddot{-}} \cdot O_2$$

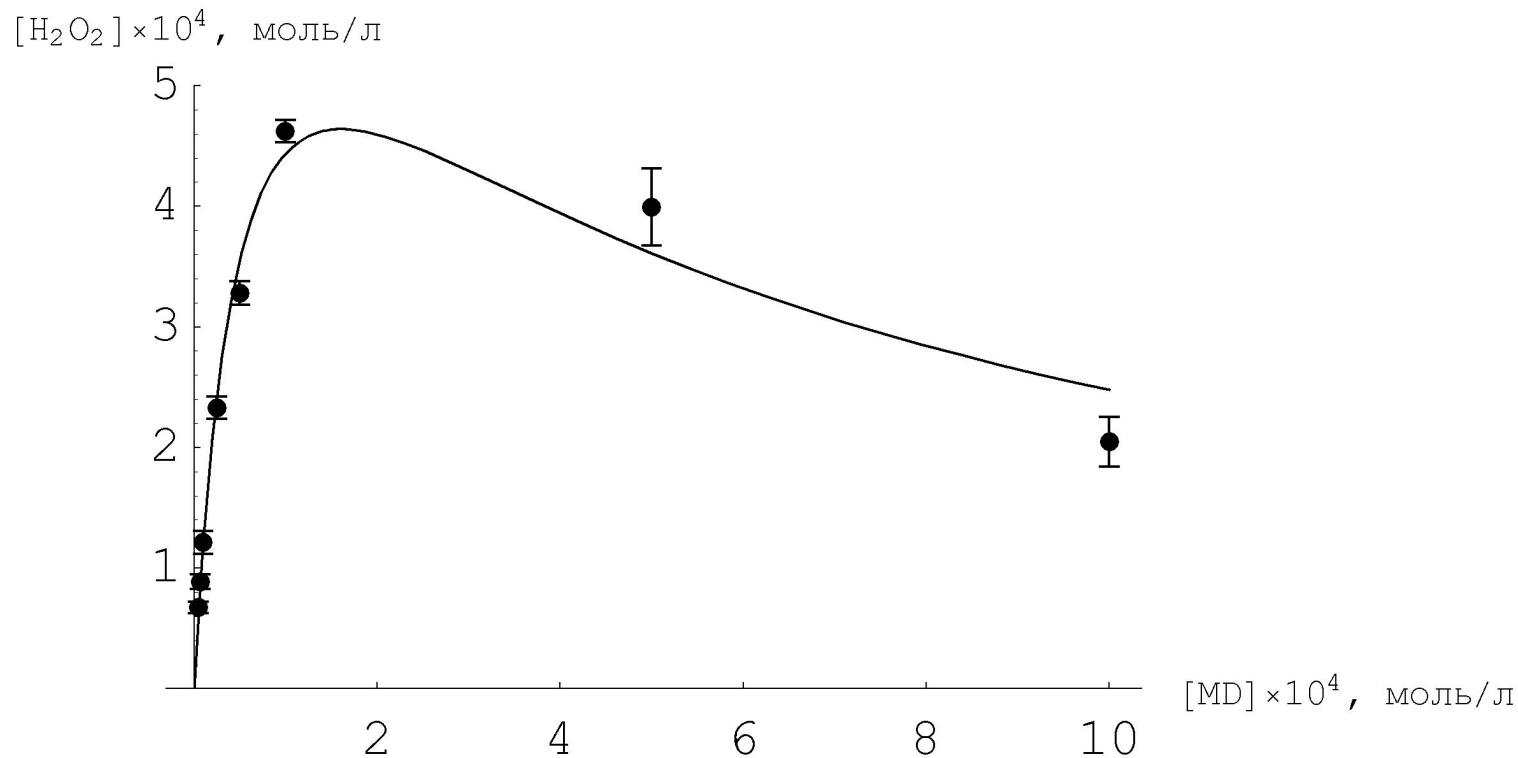
$$\frac{dMD^{\ddot{-}}}{dt} = \frac{v_{E_1} MD}{k_{E_1} + MD + k \cdot MD^2} - k_4 MD^{\ddot{-}} \cdot O_2$$

$$\frac{dO_2^{\ddot{-}}}{dt} = k_4 MD^{\ddot{-}} \cdot O_2 - k_7 (O_2^{\ddot{-}})^2 \quad \frac{dH_2O_2}{dt} = k_7 (O_2^{\ddot{-}})^2 - k_{sc} \cdot H_2O_2$$

$$[MD^{\ddot{-}}]_{t=0} = 0 \quad [H_2O_2]_{t=0} = 0 \quad [O_2^{\ddot{-}}]_{t=0} = 0 \quad [MD]_{t=0} = 0$$

$$[H_2O_2]_0 = \frac{1}{k_{sc}} \frac{v_{E_1} [MD_0]}{k_{E_1} + [MD_0] + k \cdot [MD_0]^2}$$

Рис.7. Экспериментальная и теоретическая зависимости концентрации пероксида водорода в клетках линии U251 от концентрации добавленного менадиона при ингибировании двухэлектронного восстановления хинона



$$\alpha = (7,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}, k_{E1} = (5,30 \pm 0,05) \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}, k = (2,0 \pm 0,3) \cdot 10^3 \text{ (моль/л)}^{-1}$$

Выводы:

- 1. Менадион – жирорастворимый аналог витамина K_3 , и викасол – водорастворимый аналог витамина K_3 , индуцируют дозозависимое образование пероксида водорода в клетках глиомы человека линии U 251 и клетках глиомы крысы линии С6. Максимальный выход пероксида водорода в клетках регистрируется при концентрации менадиона - $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и при концентрации викасола - $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л.
- 2. Менадиониндуцированное образование АФК осуществляется ферментативными системами, связанными с мембранами.



Выводы:

- 3. Менадиониндуцированное образование АФК осуществляется при участии ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление хинона.
- 4. Предложена теоретическая модель генерации пероксида водорода в клетках глиомы, включающая два конкурирующих процесса: одно- и двухэлектронное восстановление менадиона. Полученные теоретические зависимости хорошо согласуются с экспериментальными данными. Полученные константы химических реакций для одноэлектронного восстановления менадиона равны: $\alpha = (7,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$ моль/л, $k_{E1} = (5,30 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$ моль/л, $k = (2,0 \pm 0,3) \cdot 10^3$ (моль/л)⁻¹.

Спасибо за внимание!

