УДК 577.359

ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА SNP НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА IN VITRO

Куприянова Е.С.[1,2], Наумов А.А. [1,2], Серебрякова Л.Т. [2], Поцелуева М.М. [1, 2]

[1]ФГБОУ ВПО «Пущинский государственный естественно-научный институт». (Пущино, Россия (142290, Пущино, ул. Проспект науки 3), e-mail: andrey.130@gmail.com
[2]ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН». (Пущино, Россия (142290, Пущино, ул. Институтская 3), e-mail: andrey.130@gmail.com

Одним из ключевых направлений современной науки является изучение механизмов возникновения, развития и лечения злокачественных новообразований. Совершенствование методов химиотерапии требует усиленного исследования механизмов цитотоксического действия новых химических препаратов. В настоящее время ключевая роль в регрессии опухолей отводится активным формам кислорода, азота и их метаболитам. Целью исследования являлось изучение действия различных концентраций (от 0,02 мМ до 2 мМ) донора оксида азота нитропруссида натрия (SNP) на рост опухолевых клеток асцитной гепатомы Зайдела. Установлено, что SNP оказывает цитотоксический дозозависимый эффект по отношению к данному типу клеток в условиях культивирования in vitro. Однако концентрации SNP ниже 0,2 мМ способствуют пролиферации клеток асцитной гепатомы Зайдела, что было установлено при анализе фаз клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии.

Ключевые слова: клеточный цикл, опухолевый рост, оксид азота, гепатома Зайдела.

EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF NITROGEN OXIDE DONOR SNP ON ZEIDEL ASCITES HEPATOMA CELLS SURVIVAL IN VITRO

Kupriyanova E.S. [1,2], Naumov A.A. [1.2]., Serebryakova L.T. [2], Potselueva M.M. [1, 2]

[1]Pushchino State Institute of Natural Sciences. (142290, Pushchino, street Prospect nauki 3), e-mail: andrey.130@gmail.com
[2]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS. (142290, Pushchino, street Institutskaya 3), e-mail: andrey.130@gmail.com

One of the key areas of modern science is the study of mechanisms of occurrence, development and treatment of malignant neoplasms. Improving methods of chemotherapy requires intensive study of the mechanisms of action of new cytotoxic chemicals. At present studies, the key role in the regression of tumors is assigned to reactive oxygen species. The purpose of this study was to investigate the effect of various concentrations (0,02 mM to 2 mM) of the nitrogen oxide donor – sodium nitroprusside (SNP) on the growth of Zeidel ascites hepatoma cells. It was found that SNP produces a cytotoxic dose-dependent effect (action) to the cells of this type under conditions of in vitro cultivation. However, SNP concentrations below 0.2 mM are favourable for proliferation of Zeidel ascites hepatoma cells, which was recognized by analysis of cell cycle phases by the method of cytofluorometry.

Keywords: cell cycle, tumor growth, nitric oxide, ascites Zeidel hepatoma.

В настоящее время одну из важных ролей в регрессии опухолей отводят активным формам кислорода и азота. Оксид азота и его метаболиты являются сильным цитотоксическим оружием иммунной системы, оказывающим как прямое повреждающее действие на клетки, так и косвенное, путем регуляции клеточного цикла и процессов клеточной гибели.

Оксид азота (NO) является важным регуляторным фактором, участвующим в индукции апоптоза [4], пролиферации клеток [2] и тонуса сосудов [3]. В то же время активные метаболиты азота наряду с активными формами кислорода способны повреждать

различные клеточные структуры, изменяя их функциональную активность. Так, процесс нитрозилирования белков под действием активных форм азота является одним из механизмов регуляции активности некоторых ферментных систем [7]. Следует отметить, что некоторые метаболиты NO, такие как S-нитрозотиолы и сам NO, при определённых условиях могут проявлять антиоксидантную активность [5]. Например, оксид азота может связываться с ионами железа, которые катализируют реакции свободно-радикального окисления.

Различные исследования показали роль NO в индукции генотоксического повреждения, а также его участие в продвижении опухоли и прогрессии от посреднических важных процессов, в том числе ангиогенеза, роста опухолевых клеток, и инвазии [6]. При этом оксид азота является важным компонентом иммунной реакции при росте некоторых типов опухолей, например, защищает от рака толстой кишки у мышей [10]. Высокие уровни NO обладают сильной генотоксичностью через образование канцерогенных нитрозаминов или путём повреждения систем репарации ДНК [8]. Однако NO также способен и уменьшать воздействие активных форм кислорода на ДНК [9].

Асцитная гепатома Зайдела является перевиваемой культурой и при её трансплантации в брюшную полость развивается асцитная форма опухоли, которая представляет собой клеточные комплексы и отдельные клетки, растущие в сильно геморрагической асцитической жидкости. Эта культура является удобной моделью исследования действия противоопухолевых препаратов на рост опухоли в организме. Однако доля исследований, посвященных изучению изолированных клеток данной опухоли in vitro в настоящее время незначительна. В данной работе было исследовано действие различных концентраций экзогенного донора оксида азота SNP на выживаемость клеток асцитной гепатомы Зайдела, культивируемых в питательной среде.

Материалы и методы исследования.

Для формирования опухоли использовали клетки асцитной гепатомы Зайдела, хранящиеся в криобанке. Клетки трансплантировали в брюшную полость крысы путем введения 0,8 мл клеток в количестве $1 \cdot 10^7$ кл/мл. Образовавшеюся асцитную жидкость отбирали на 5 сутки после трансплантации, центрифугировали при 400g в течение 10 мин., затем отмывали 2 раза в растворе NaCl (0,9%). Отмытые клетки наслаивали на градиент Percoll – NaCl с плотностями 1,04, 1056 и 1,078 г./мл. и центрифугировали 40 мин при 4000g. Далее отбирали шприцом слой опухолевых клеток на границе плотности 1,056 г./мл., Фракцию клеток промывали 2 раза средой DMEM. Эксперименты проводили в культуральных планшетах в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой при 37°С, концентрация CO2 - 5%. Объем среды культивирования 0,7 мл, начальная

концентрация клеток 10^6 кл./мл. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Определение жизнеспособности клеток осуществляли по окраске трипановым синим. Клеточный цикл регистрировали с помощью проточной цитометрии с окрашиванием пропидиумиодитом (PI). Для этого клетки гепатомы Зайдела фиксировались 70% C_2H_5OH. Пробы центрифугировали 10 минут при 400g, удаляли спиртовую фракцию и добавляли 500мкл 0,0035% раствора (Pl) и 500 мкл 0,0035% раствора РНКазы в фосфатном буфере. Пробы инкубировали в термостате 30 минут при температуре 37°С. Затем проводили исследование на проточном цитофлюориметре (Partec PAS III, Германия)

Результаты исследования и их обсуждение

Для проведения исследования опухолевые клетки отбирались из асцитной жидкости экспериментального животного на II фазе развития экспериментальной опухоли. В этот период наблюдается интенсивный рост популяции клеток гепатомы Зайдела, а патологический процесс в организме не перешёл в необратимую фазу и, следовательно, ещё актуально проведение противоопухолевой терапии [1]. Выделенные клетки являются переживающей культурой и длительное их культивирование in vitro невозможно. В связи с этим эксперимент ограничен 24ч.

На рис. 1 представлены кривые роста асцитной гепатомы Зайделя в присутствие различных концентраций донора оксида азота SNP. Как видно из рисунка в процессе культивирования контрольных клеток гепатомы (в отсутствие SNP) в течение первых 12ч. наблюдается рост концентрации опухолевых, сменяемый устойчивой гибелью клеток при дальнейшем культивировании. При внесении в среду культивирования источника оксида азота (нитропрусида натрия - SNP) был отмечен нелинейный эффект действия различных концентраций данного соединения. Так при концентрации SNP ~0,02 мМ через 12 часов культивирования наблюдается достоверное увеличение количества клеток гепатомы по сравнению с контрольным образцом. По-видимому, данный эффект обусловлен активирующим воздействием данной концентрации SNP на пролиферативную активность клеток. При дальнейшем культивировании клеток эффект SNP несколько снижается и к 24 часам концентрация клеток практически не отличалась от контрольных значений. При дальнейшем ступенчатом увеличении концентрации донора NO до 0,2мМ, 1мМ и 2мМ количество опухолевых клеток в единице объема дозозависимо снижалось, что свидетельствует о цитотоксическом эффекте (рис 1, кривые 3,4 и 5).

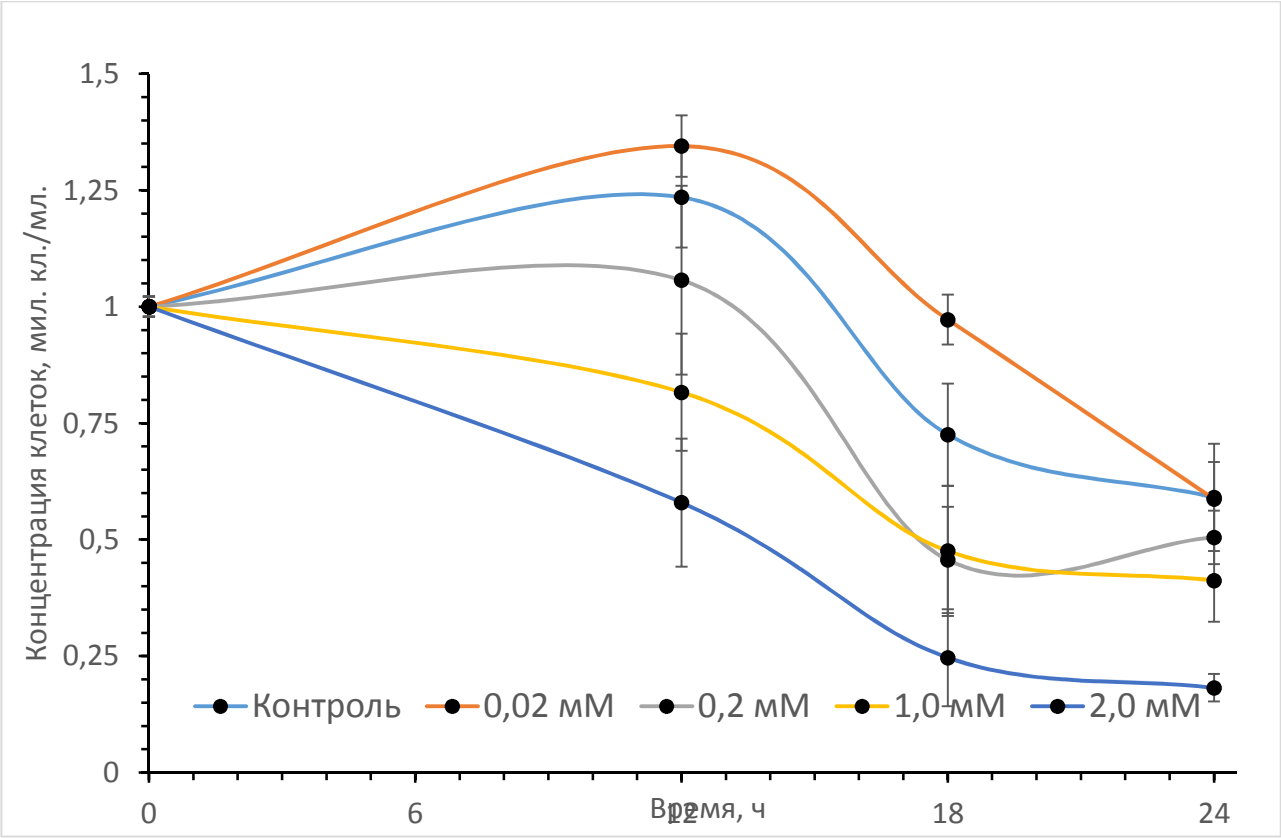
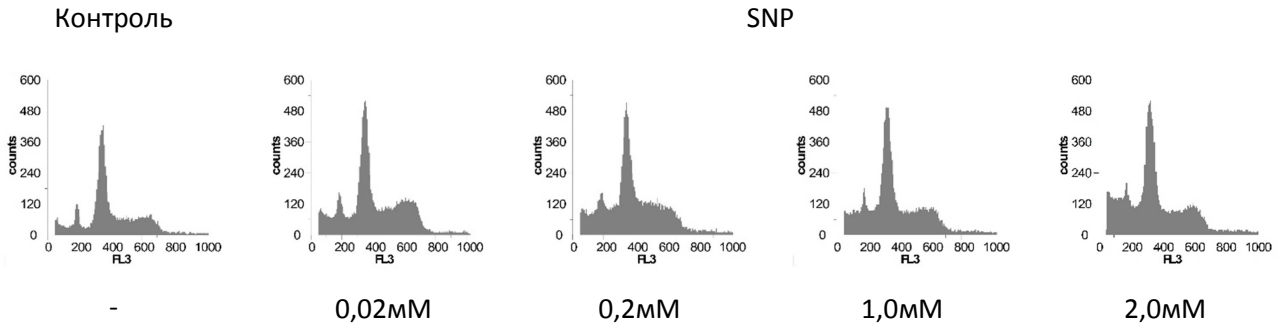


Рис. 1 Влияние различных концентраций донора оксида азота (SNP) на рост клеток асцитной гепатомы Зайдела. Культивирование проводилось в культуральных планшетах в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой при 37°C, концентрация CO_2 - 5%. Объем среды культивирования 0,7 мл, начальная концентрация клеток 10^6 кл./мл. Аналогичные результаты были получены в пяти независимых экспериментах.

Используя метод проточной цитофлуориметрии, было исследовано состояние клеточного цикла опухолевых клеток по истечению 12 ч культивирования. Обнаружено, что с ростом концентрации SNP в среде культивирования увеличивается sub-G1 область на гистограмме клеточного цикла (рис 2), что говорит об увеличение фрагментации ДНК, и как следствие, гибели клеток. Это свидетельствует о цитотоксической активности SNP по отношению к клеткам гепатомы, обусловленной способностью оксида азота индуцировать апоптоз.

Наряду с цитотоксическим воздействием SNP на клетки гепатомы обнаружено, что при концентрации SNP ~ 0,02 мМ увеличивается доля клеток, находящихся в S и G2/M фазах клеточного цикла, что говорит об активации клеточного деления. Это увеличение пролиферативной активности не только компенсирует цитотоксический эффект SNP, но и позволяет увеличить популяцию клеток гепатомы в течении первых 12-18 ч культивирования. Дальнейшее увеличение концентрации донора оксида азота до 0,2мМ приводит к увеличению доли клеток в предмитотической фазе S и снижению в G2/M. В

результате этого цитотоксический эффект уже не полностью компенсируется, что подтверждается снижением выживаемости клеток гепатомы Зайдела при культивировании (рис. 2) Дальнейшее увеличение концентрации SNP приводит к увеличению гибели клеток, причем, в основном, за счет находящихся в S и G2/M фазах клеточного цикла.



	контроль	SNP 0,02 мМ	SNP 0,20 мМ	SNP 1,00 мМ	SNP 2,00 мМ
Sub-G1	16,7%	19,7%	22,6%	23,3%	28,9%
G1	51,7%	44,7%	45,3%	48,0%	45,6%
S	13,0%	13,6%	16,0%	13,0%	11,1%
G2/M	18,6%	22,0%	16,1%	15,7%	14,4%

Рис. 2 Анализ клеточного цикла клеток асцитной гепатомы Зайдела, инкубированных в присутствии SNP с концентрациями 0,02 мМ; 0,2 мМ; 1,0 мМ; 2,0 мМ. Клетки окрашивали PI после 12 часов культивирования. Клеточный цикл представлен как процент клеточной популяции в различных фазах (sub-G 1; G1; S; G2/M) За мертвые клетки принимали sub-G1 область гистограммы. Аналогичные результаты были получены в пяти независимых экспериментах.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что концентрация донора оксида азота SNP больше 0,2мМ оказывает цитотоксический эффект по отношению к клеткам гепатомы Зайдела в условиях in vitro. При этом в значительной мере снижется доля делящихся клеток. Подобный эффект является поводом для использования доноров оксида азота как противоопухолевого агента в комплексной терапии онкологических заболеваний. Однако надо учитывать, что концентрации SNP ниже 0,2 мМ, напротив, увеличивают пролиферации клеток и, следовательно, способствуют росту опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (№ 214/281).

Список литературы

1.Наумов А.А., Зинатуллина Г.Г., Поцелуева М.М.. метаболиты оксида азота как маркеры фаз развития асцитной гепатомы Зайделя. Современные проблеммы науки и образования, 2012; № 6

2.Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. Gene. 2004 Aug 4;337:1-13.

3.Gregg D, de Carvalho DD, Kovacic H. Integrins and coagulation: a role for ROS/redox signaling? Antioxid Redox Signal. 2004 Aug;6(4):757-64.

4.Hildeman DA. Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 2004 Jun 15;36 (12):1496-504.

5.Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, and Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. FEBS Lett 334: 170-174, 1993.

6.Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3:276–285.

7.Kozlov AV, Staniek K, and Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. FEBS Lett 454: 127-130, 1999.

8.Laval F, Wink DA, Laval J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1997;131:175–191.

9.Yoshie Y, Ohshima H. Nitric oxide synergistically enhances DNA strand breakage induced by polyhydroxyaromatic compounds, but inhibits that induced by the Fenton reaction. Arch Biochem Biophys. 1997;342:13–21.

10.Zhang R, Ma A, Urbanski SJ, McCafferty DM. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. Carcinogenesis. 2007;28:1122–1130.

Рецензенты:

Новоселова Е.Г., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции ФГБУН Института биофизики клетки РАН, г. Пущино;

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики внутриклеточной регуляции ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино.