

ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Е. В. Духанина, Ю. А. Лысенко, М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 16.01.2012 г.

Аннотация. Методом электрофореза в геле агарозы (1,5 %) и путем определения жизнеспособности клеток с использованием трипанового синего исследованы степень фрагментации ДНК и изменения целостности мембран клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), извлеченных из перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI на 7-е (клетки 1-го типа) и 12-е (клетки 2-го типа) сут после имплантации опухоли, в условиях воздействия пероксида водорода (10^{-3} моль/л). Установлено, что после однократного введения H_2O_2 в суспензию клеток ($1,2 \cdot 10^6$ кл./мл) в среде RPMI 1640 через 24 ч наблюдается снижение их жизнеспособности до уровня 21—31 %, сохраняющегося по истечении 48 ч после внесения модификатора. Выявлена различная степень ответной реакции клеток АКЭ, находящихся на стадиях экспоненциального (7 сут) и стационарного (12 сут) роста, на внесение пероксида водорода: процесс деградации высокомолекулярной фракции ДНК инициируется в клетках 2-го типа уже после 24 ч инкубации и носит стохастический характер, в то время как для клеток 1-го типа в аналогичных условиях степень выраженности фрагментации ДНК оказалась ниже. Кроме того, в образцах ДНК клеток 1-го типа через 48 ч после добавления H_2O_2 наблюдались дискретные низкомолекулярные полосы, что может свидетельствовать о наличии межнуклеосомной фрагментации полинуклеотида.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, жизнеспособность, пероксид водорода, фрагментация ДНК.

Abstract. By electrophoresis in agarose gel (1.5 %) and by determining cell viability using trypan blue spepen investigated by DNA fragmentation and changes in the integrity of cell membranes of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) (extracted from the peritoneal cavity of mice, outbred NMRI runoff on the 7th (the cells type 1) and 12th (cell type 2) days after tumor implantation) under the action of hydrogen peroxide (10^{-3} mol/l). Found that after a single injection of H_2O_2 in the cell suspension ($1,2 \cdot 10^6$ /ml) in RPMI 1640 medium at 24 h decrease their viability to the level of 21—31%, continuing after 48 h after application of the modifier. Revealed varying degrees of response of EAC cells, which are at the stage of exponential (7 days) and stationary (12 days) of growth, the introduction of hydrogen peroxide: the degradation of high molecular weight fraction of DNA is initiated in the cells of type-2 after 24 h of incubation and is stochastic in nature, while for the cells of type 1 under similar conditions, the severity of DNA fragmentation was lower. In addition, DNA samples of cells of type 1 at 48 h after the addition of H_2O_2 observed discrete lower molecular weight band, which may indicate the presence of internucleosomal fragmentation of the polynucleotide.

Keywords: DNA fragmentation, Ehrlich ascites carcinoma, hydrogen peroxid, viability.

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция клеточной пролиферации в нормальных и трансформированных клетках — фундаментальная проблема биологии. Ее актуальность возрастает в связи с широким распространением, особенно в последние годы, заболеваний, связанных с неконтролируемым делением клеток [1]. В здоровых тканях устанавливается баланс между процессами пролиферации и гибели клеток [2—4]. В противоположность этому, злокачественный рост основан на автономном и неограниченном размно-

жении клеток, составляющих ткань опухоли [5, 6]. Изучение особенностей гибели опухолевых клеток, в частности, апоптоза, резистентность трансформированных клеток к которому является одним из ключевых механизмов их выживания [7, 8], открывает возможности для обнаружения новых внутриклеточных мишеней терапевтического воздействия, а также стимулирует поиск более специфичных противоопухолевых агентов, способных индуцировать клеточную смерть в клетках опухоли.

Регуляция клеточной смерти на молекулярном уровне осуществляется за счет самых разнообразных факторов, обладающих активирующим, либо

ингибирующим влиянием на данный процесс [9]. Существенную роль в системе контроля программной клеточной гибели играют активные формы кислорода (АФК), осуществляющие регуляцию редокс-состояния клетки и выступающие на разных уровнях сигнальных путей в качестве мессенджеров апоптогенного стимула [10].

Пероксид водорода (H_2O_2) является наиболее стабильным из интермедиатов восстановления кислорода [11]. H_2O_2 относят к окислителям средней силы; в отсутствие каталазы, глутатионпероксидазы и ионов металлов переменной валентности он относительно стабилен и может мигрировать в клетки и ткани.

В связи с вышеизложенным представляется необходимым проведение исследований, направленных на изучение механизмов протекания гибели клеток опухоли, в частности асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), в условиях воздействия пероксида водорода, что позволит приблизиться к пониманию патогенетических особенностей развития и функционирования неопластических образований.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились образцы перитонеального экссудата мышей аутбредного стока NMRI в возрасте 2—3 мес. Суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха перевивали интраперитонеально на стадии экспоненциального роста опухоли (7-е сут). Концентрация суспензии асцитной карциномы Эрлиха в экспериментах составила $1,25 \cdot 10^5$ кл./мл. Подсчет концентрации клеток осуществляли с помощью камеры Горяева.

Число жизнеспособных клеток во взвесах определяли методом эксклюзии трипанового синего [12]. Суспензию клеток инкубировали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 .

Для изучения влияния H_2O_2 на клетки карциномы Эрлиха в суспензию клеток, взятую в количестве 0,9 мл, добавляли 0,1 мл H_2O_2 (10^{-2} моль/л), концентрацию которого определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $43,6 \text{ л} \times (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$.

Выделение ДНК из клеток карциномы Эрлиха осуществляли при помощи набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия). Изменения размеров фракций ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (1,5 %). Размеры фрагментов ДНК определяли с помощью маркера молекулярных масс FastRuler™ High Range DNA Ladder

#SM1123 (Fermentas, США), который представляет собой набор из 5 ДНК-фрагментов длиной 10000, 4000, 2000, 1000 и 500 пар нуклеотидов.

Обработку результатов экспериментов проводили методами параметрической статистики с использованием пакета программ «Microsoft Office Excel 2003».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенных экспериментах использовались клетки асцитной формы опухоли Эрлиха, извлеченные на 7-е (условно обозначенные нами как клетки 1-го типа) и 12-е сут (клетки 2-го типа) пролиферации в перитонеальной полости мышей, что соответствует экспоненциальной и стационарной фазам развития неоплазмы.

В суспензию клеток АКЭ ($1,2 \cdot 10^6$ кл./мл в среде RPMI 1640) однократно вносили раствор пероксида водорода, конечная концентрация которого составила 10^{-3} моль/л. После инкубации образца в течение 1 ч он был разделен на две части: у первой была осуществлена смена среды на новую порцию, не содержащую модификатора, вторая оставлена для дальнейшей инкубации без отмывки от оставшейся части молекул H_2O_2 , возможных растворимых интермедиатов, образующихся при его взаимодействии с компонентами клеточной мембраны, среды RPMI и продуктов клеточной секреции. Второй образец инкубировался без отмывки от H_2O_2 . Затем через 6, 24 и 48 ч после модификации суспензии нами были исследованы изменения концентрации клеток в образце, уровень их жизнеспособности, оцениваемый по степени целостности цитоплазматической мембраны, а также электрофоретические характеристики ДНК, выделенной из клеток неоплазмы.

На рис. 1, 2 представлены данные по изменению концентрации клеток АКЭ в суспензии и уровня их жизнеспособности после воздействия пероксида водорода. Через 6 ч инкубации не выявлено статистически значимых отличий вышеуказанных параметров клеток по отношению к уровню контрольного образца (клеточной суспензии, инкубированной в течение того же времени, но без внесения пероксида водорода), однако через 24 и 48 ч наблюдалось снижение жизнеспособности клеток до 21—31 %. Причем характер и величина указанных изменений данных изменений оказались сходными как в отношении суспензии с отмывкой и без отмывки от модификатора, так и для клеток 1-го и 2-го типов. Выявлено также снижение количества клеток в исходной суспензии в процессе

инкубации (рис. 2), что может свидетельствовать о лизисе их части.

Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют о нарушении целостности цитоплазматической мембраны в результате непосредственного и опосредованного клеточными компонентами воздействия пероксида и продуктов его превращения на мембранные структуры. Однако, поскольку известно, что клетки АКЭ обладают способностью к эндоцитозу, нельзя исключить и факт активации этого процесса после добавления модификатора, и, как следствие, увеличения степени проникновения трипанового синего внутрь клетки.

Таким образом, примененными способами не удалось выявить различий в чувствительности клеток АКЭ 1-го и 2-го типов к действию пероксида водорода (10^{-3} моль/л).

Одной из ключевых характеристик процессов, протекающих внутри клетки, является состояние ее геномной ДНК, модификация которой, в частности, появление разрывов полинуклеотидной цепи, может служить индикатором реакций как непосредственного взаимодействия с пероксидом водорода, так и индукции каскада внутриклеточных биохимических превращений, приводящих к ее ферментативной деградации. В последнем случае характер локали-

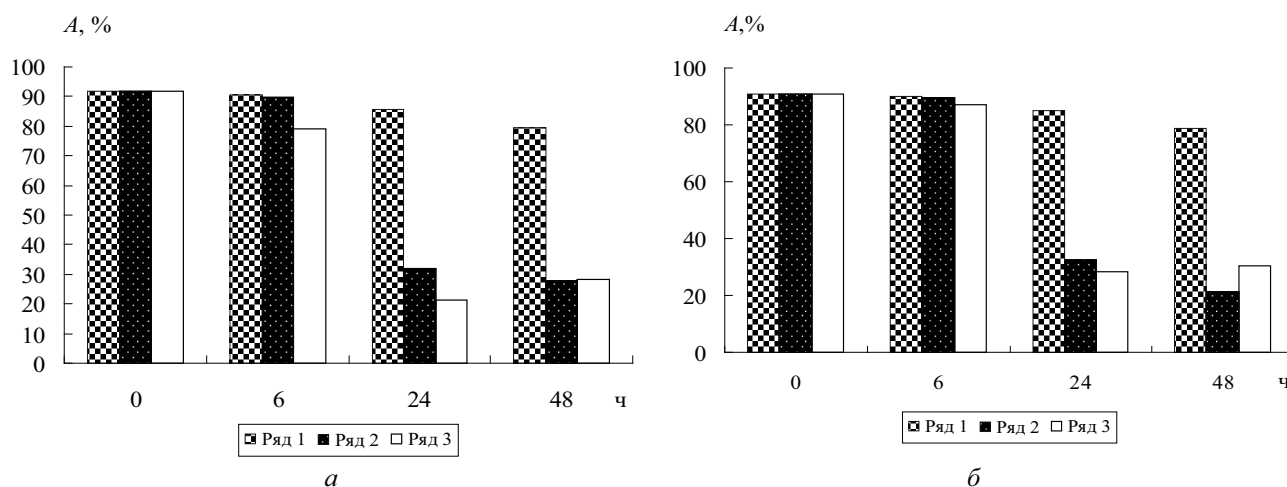


Рис. 1. Изменения жизнеспособности клеток АКЭ, извлеченных на 7-е (а) и 12-е (б) сут развития опухоли, после добавления в условиях *in vitro* пероксида водорода (10^{-3} моль/л): по оси ординат — жизнеспособность, %; по оси абсцисс — время инкубации; 1 — контроль (немодифицированная суспензия клеток); 2 — суспензия, отмытая от модификатора после его воздействия в течение 1 ч; 3 — суспензия без отмытки

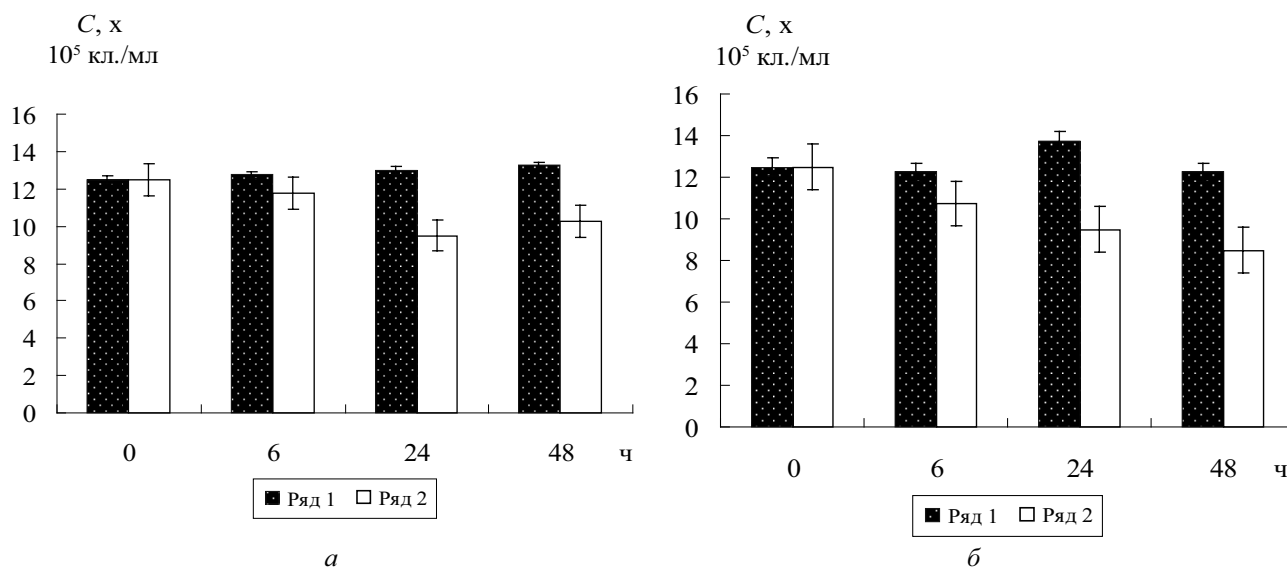


Рис. 2. Изменения концентрации клеток АКЭ, извлеченных на 7-е (а) и 12-е (б) сут развития опухоли, в суспензии после добавления в условиях *in vitro* пероксида водорода (10^{-3} моль/л): по оси ординат — концентрация, кл./мл; по оси абсцисс — время инкубации; 1 — контроль (немодифицированная суспензия клеток); 2 — суспензия + пероксид водорода

зации разрывов цепи может быть различным и определяется активацией нуклеаз различных типов, в зависимости от направления индуцируемых в клетке процессов. Так, в условиях апоптогической гибели клетки в результате деятельности соответствующих ферментов разрывы цепей осуществляются преимущественно в межнуклеосомных участках, при этом образуются фрагменты, кратные 180—200 п. н., выявляемые при электрофоретическом разделении в виде «лестницы». В случае некротической гибели клетки разрывы ДНК носят стохастический характер, образуются фрагменты молекул с непрерывно уменьшающимися размерами. Электрофоретическая картина при этом представляет собой «размазанную» полосу, шмер (smear).

Нами выявлено, что однократная обработка клеток АКЭ пероксидом водорода не вызывает тестируемых примененным методом изменений размеров ДНК клеток 1-го и 2-го типов после 6 ч инкубации — фракция полинуклеотида представлена полосой с молекулярной массой более 10000 п. н. (рис. 3а, 4а; дорожки 2—3). Однако спустя 24 и 48 ч выявляется фрагментация ДНК.

Для электрофоретических свойств ДНК клеток 1-го типа (рис. 3) были характерны следующие

изменения. В образце ДНК, выделенном из клеточной суспензии, отмытой от модификатора, через 48 ч на фоне сохраняющейся высокомолекулярной составляющей наблюдается размывание границы ее нижнего контура и появление шмера, простирающегося до 500 и менее п. н. (рис. 3в, дорожка 2). Для ДНК клеток, не отмытых от среды, высокомолекулярная полоса отсутствует и наблюдается шмер с диапазоном варьирования размеров фрагментов от 10000 до 500 и менее п. н. (основная доля выявляемых при этом фрагментов находится в диапазоне от 10000 до 2000 п. н.), на фоне которого различимы 3 дискретные полосы (рис. 3в, дорожка 3), соответствующие, вероятно, межнуклеосомным фрагментам ДНК. Так как разрывы последнего типа является одним из критериев апоптогической гибели клетки, можно предположить реализацию этих процессов у части клеток в данной системе.

Результаты аналогичных экспериментов, проведенных в отношении клеток АКЭ 2-го типа, представлены на рис. 4. В данном случае уже через 24 ч после введения пероксида водорода наблюдается деградация ДНК с образованием фрагментов в диапазоне от 10000 до 2000 п. н. (рис. 4б, дорож-

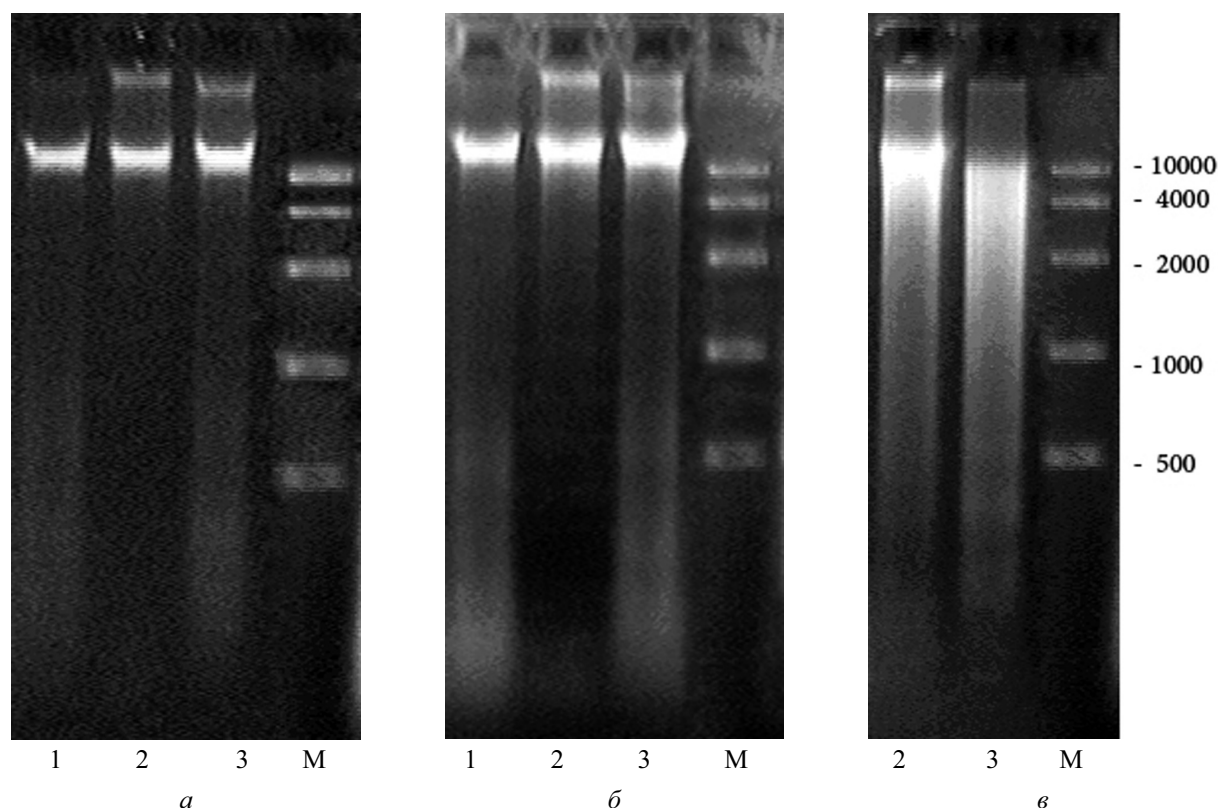


Рис. 3. Изменения электрофоретических характеристик образцов ДНК клеток АКЭ, извлеченных на 7-е сут развития опухоли, после добавления в условиях *in vitro* пероксида водорода (10^{-3} моль/л). Время инкубации: а — 6 ч; б — 24 ч; в — 48 ч; 1 — контроль (немодифицированная суспензия клеток); 2 — суспензия, отмытая от модификатора после его воздействия в течение 1 ч; 3 — суспензия без отмывки; М — маркер молекулярных масс

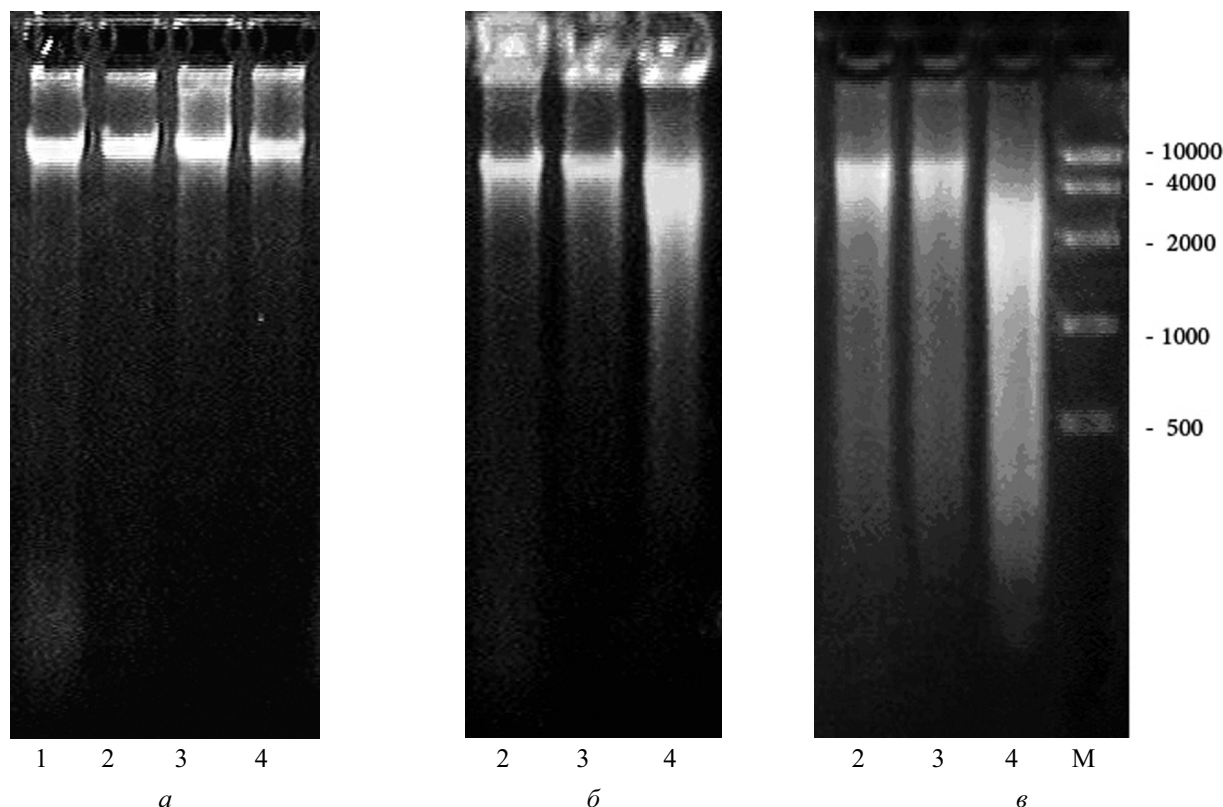


Рис. 4. Изменения электрофоретических характеристик образцов ДНК клеток АКЭ, извлеченных на 12-е сут развития опухоли, после добавления в условиях *in vitro* пероксида водорода (10^{-3} моль/л). Время инкубации: а — 6 ч; б — 24 ч; в — 48 ч; 1 — контроль (до инкубации); 2 — контроль (немодифицированная суспензия клеток); 3 — суспензия, отмытая от модификатора после его воздействия в течение 1 ч; 4 — суспензия без отмытки; М — маркер молекулярных масс

ка 3). После 48 ч инкубации число разрывов цепей ДНК увеличивается: выявляются фрагменты с непрерывно уменьшающейся длиной с максимальным размером 4000 п. н. (рис. 4в, дорожка 4). Шмер при этом имеет сходную интенсивность свечения на всем его протяжении. Дискретных полос на его фоне выявить не удалось.

Таким образом, установлено, что клетки АКЭ, находящиеся на различных стадиях развития асцитной опухоли *in vivo*, обнаруживают *in vitro* различную степень ответной реакции на воздействие пероксида водорода в концентрации 10^{-3} моль/л: клетки, находящиеся в стационарной фазе роста, характеризуются более выраженной модификацией молекул ДНК и, вероятно, других клеточных компонентов, что индуцирует гибель клеток по типу некроза. Более ранняя индукция процессов фрагментации ДНК суспензии клеток, инкубированных без отмытки от H_2O_2 , может свидетельствовать о важной роли интермедиатов различной природы, возникающих в результате взаимодействия пероксида с компонентами биосистемы, в процессе трансдукции сигнала внутри

клетки и развития каскада последующих реакций, приводящих в конечном счете к фрагментации молекул ДНК. Дальнейшие исследования будут направлены на детализацию механизмов протекающих при этом процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Замай А. С. Регуляция пролиферативной активности асцитных клеток в динамике роста карциномы Эрлиха : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. С. Замай. — Иркутск, 2007. — 24 с.
2. Allen R. G. Oxidative stress and gene regulation / R. G. Allen, M. Tressini // *Free Radical Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28. — P. 463—499.
3. Ambs S. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression / S. Ambs, S. P. Hussain, C. C. Harris // *FASEB J.* — 1997. — Vol. 11. — P. 443—448.
4. Musarrat J. Prognostic and etiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis / J. Musarrat, J. Arezina-Wilson, A.A. Wani // *Eur. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 32A. — P. 1209—1214.
5. Коломийцева И. К. Радиационная биохимия мембранных липидов / И. К. Коломийцева. — М. : Наука, 1989. — 181 с.

6. Манухина Е. Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е. Б. Манухина, И. Ю. Малышев, Ю. В. Архипенко // Вестник РАМН. — 2000. — № 4. — С. 16—21.
7. Напалков Н. П. Рак и демографический переход / Н. П. Напалков // Вопросы онкологии. — 2004. — Т. 50, № 2. — С. 127—144.
8. Суханов В. А. Механизмы гормональной регуляции роста опухолевых клеток / В. А. Суханов // Успехи биологической химии. — 1995. — Т. 35. — С. 97—134.
9. Потапнев М. П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М. П. Потапнев // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 4. — С. 237—243.
10. Рязанцева Н. В. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Н. Ю. Часовских // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2008. — Т. 94, № 6. — С. 710—718.
11. Влияние билирубина на пероксидное окисление липидов, активность сфингомиелиназы и апоптоз, индуцированный сфингозином и УФ-облучением / Л. Б. Дудник [и др.] // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 9. — С. 1252—1262.
12. Практикум по иммунологии / под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова. — М., 2001. — 223 с.

Духанина Елена Васильевна — аспирантка кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; тел.: (473) 220-85-86

Лысенко Юлия Александровна — к.б.н., ассистент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Наквасина Марина Александровна — д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; тел.: (473) 220-85-86

Артюхов Валерий Григорьевич — профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: avg@main.vsu.ru

Dukhanina Elena V. — PhD student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; tel.: (473) 220-85-86

Lysenko Yulia A. — Ph. D., assistant professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Nakvasina Marina A. — Ph. D., professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; tel.: (473) 220-85-86

Artyukhov Valerij G. — the head of the Division, Full Professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: avg@main.vsu.ru