УДК 577.344.3

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬКЛЕТОКАСЦИТНОЙКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РОСТА ОПУХОЛИ В УСЛОВИЯХ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Ю. А. Лысенко, И. А. Косых, Д. И. Шабанов, В. В. Вирютина, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет
Поступила в редакцию 05.03.2013 г.

Аннотация. Методом световой микроскопии, путем подсчета концентрации клеток в суспензии и определения уровня их жизнеспособности, оцениваемого по изменению целостности плазмалеммы, исследованы изменения фоточувствительности в условиях in vitro суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), извлеченных на различных стадиях роста опухоли в перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI, к действию красного света (665±15 нм; 18 Дж/см^2) в присутствии сенсибилизатора — метиленового голубого (МГ; 10^{-6}; 10^{-5} и 10^{-4} моль/л). Установлено, что в названных условиях эксперимента наибольший модифицирующий эффект по отношению к клеткам опухоли обнаруживался при использовании МГ в концентрации 10^{-4} моль/л. Выявлена большая резистентность клеток АКЭ, извлеченных на 7-е сут роста, к цитотоксическому действию метиленового голубого (10^{-4} моль/л) в темновых условиях и после облучения, по сравнению с таковой клеток неоплазмы, полученных на 5-е и 12-е сут пролиферации.
Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, жизнеспособность, метиленовый голубой, фотодинамическое воздействие, фотосенсибилизатор.

Abstract. By light microscopy, by counting cell concentration in suspension and determining the level of their viability as measured by changes in the integrity of the plasmalemma, we examined the in vitro change of photosensitivity of cell suspension of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) extracted from the peritoneal cavity of mice, outbred NMRI runoff, to the action of red light (665 ± 15 nm, 18 J/cm^2) in the presence of a sensitizer methylene blue (MB; 10^{-6}, 10^{-5} and 10^{-4} mol/l). We found that the most modifying effect on the tumor cells was detected by using MB at a concentration 10^{-4} mol/l in these experimental conditions. The most resistance of EAC cells to the cytotoxic effect of methylene blue (10^{-4} mol/l) under dark conditions, and after exposure, was detected at 7th day of tumor growth as compared to neoplasms cell obtained on the 5th and 12th days proliferation.
Keywords: Ehrlich ascites carcinoma, viability, methylene blue, photodynamic action, photosensitizer.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждающий эффект генерируемых в биосистемах после введения экзогенного агента активных форм кислорода и синглетного кислорода в настоящее время находит широкое применение в клинической практике в рамках метода фотодинамической терапии злокачественных новообразований и ряда патологий неопухолевого происхождения, предполагающей использование красителя-сенсибилизатора, и, как правило, видимого света [1]. Однако молекулярно-клеточные механизмы процессов, лежащих в основе эффекта резорбции опухолей в данном случае, исследованы далеко не полностью, поэтому представляется актуальным проведение исследований на модельных системах, включающих клетки экспериментальных опухолей и экзогенные сенсибилизаторы, в условиях фотодинамического воздействия. Эффективным генератором синглетного кислорода является краситель — метиленовый голубой (МГ) [1, 2].

Одной из трудностей элиминации неопластических образований в условиях in vivo является одновременное наличие в опухолевой паренхиме пула пролиферирующих клеток, популяции покоящихся клеток, зон некроза, апоптотических и др. клеток, что обусловливает различную чувствительность опухоли к терапевтическим воздействиям.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование чувствительности клеток экспериментальной опухоли — асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), находящихся на различных стадиях роста, к действию красного света в присутствии МГ различных концентраций.

© Лысенко Ю. А., Косых И. А., Шабанов Д. И., Вирютина В. В., Артюхов В. Г., 2013

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовались клетки АКЭ, пролиферирующей в перитонеальной полости мышей-самцов аутбредного стока NMRI в возрасте 2—3 мес., извлеченные на 5-е, 7-е и 12-е сут после инокуляции опухоли. Далее клетки отмывались от асцитной жидкости путем двукратного центрифугирования при 300 g в течение 5 мин в растворе Хенкса (pH 7,4). Определение концентрации клеток в суспензии осуществляли с использованием камеры Горяева.

В условиях темновой инкубации с красителем (1 ч) и облучения в его присутствии концентрация клеток в суспензии составляла 10^7 кл./мл. В качестве источника излучения использовали аппарат «УЛОКС» (665±15 нм; 5 мВт/см^2) [3].

После соответствующих модификаций клетки помещались в среду RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением пенициллина и стрептомицина для дальнейшей инкубации при температуре 37 °С. Концентрация клеток при этом составляла 10^6 кл./мл.

Число жизнеспособных клеток в суспензии определяли методом эксклюзии трипанового синего [4]. Общую концентрацию лейкоцитов в крови мышей на различных стадиях роста АКЭ определяли (после лизиса эритроцитов) с использованием камеры Горяева. Дифференциальный подсчет производили после окраски мазков крови красителем Романовского — Гимза.

Приготовление и анализ препаратов метафазных хромосом включали следующие этапы [5—6]: остановку митоза на стадии метафазы путем добавления к клеточной суспензии колхицина и инкубирования образца в течение 2 ч при температуре 37 °С; обработку клеток гипотоническим раствором (смесь растворов хлорида калия (0,56 %) и цитрата натрия (1 %) в соотношении 1:1); фиксацию клеток смесью этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1; раскапывание клеточной суспензии с высоты 20—30 см на предметное стекло и дальнейшее высушивание на воздухе. Рутинную окраску хромосом производили в течение 5—7 мин красителем Гимза (1 %), приготовленным на фосфатном буфере (pH 6,8). По окончании окрашивания препарат промывали дистиллированной водой в течение 1—2 мин, высушивали и анализировали под микроскопом с иммерсионным объективом ×90.

Обработку результатов экспериментов проводили методами параметрической статистики с использованием программы «Statistica».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами исследованы изменения концентрации и уровня жизнеспособности клеток АКЭ, извлеченных на различных стадиях роста опухоли (5-е, 7-е и 12-е сут после инокуляции в перитонеальную полость мышей), после их темновой инкубации (1 ч), а также облучения красным светом (665 нм; 18 Дж/см^2) в присутствии МГ в концентрациях 10^{-6}; 10^{-5} и 10^{-4} моль/л. Далее образцы отмывались от модификатора и помещались в среду RPMI 1640 для дальнейшей инкубации. Значения исследуемых показателей измеряли через 4, 24 и 48 ч. Концентрация клеток при модификации в присутствии МГ составляла 10 млн/мл, в условиях культивирования в среде RPMI — 1 млн/мл.

На рис. 1 а и б представлены значения концентрации клеток в суспензии и уровня их жизнеспособности после фотомодификации образцов АКЭ в присутствии МГ, извлеченных на 5-е сут роста опухоли. Из анализа данных, приведенных на рисунке, следует, что МГ в концентрациях 10^{-6}; 10^{-5} и 10^{-4} моль/л оказывает цитотоксическое действие на клетки АКЭ, причем степень его выраженности увеличивается с ростом концентрации модификатора и в условиях облучения красным светом. Так, непосредственно после фотомодификации в присутствии МГ (10^{-4} моль/л) выявляется статистически значимое снижение жизнеспособности клеток опухоли (рис. 1б, кривая 4б), в то время как для остальных образцов подобные изменения не обнаружены. Через 4 ч инкубации различия в уровнях концентрации и жизнеспособности между группами образцов, инкубированных с МГ в темновых условиях (рис. 1б, кривые а) и облученных в его присутствии (рис. 1б, кривые б), возрастают: в первом случае значения исследуемых параметров статистически значимо не отличались от контрольных величин, а во втором — регистрировалось снижение уровня жизнеспособности клеток, достигающее максимального значения (17,6 %) в случае использования МГ (10^{-4} моль/л). Спустя 24 ч в образцах, инкубированных с МГ (10^{-4} моль/л), с помощью применяемого метода анализа клетки не выявлялись, а в случае суспензии клеток, облученных с красителем в аналогичной концентрации, наблюдался крайне низкий уровень жизнеспособности (10,9 %). Дальнейшее наблюдение за изменениями исследуемых показателей позволило выявить, что через 48 ч в образцах, инкубированных с МГ (10^{-6} моль/л) и облученных в смеси с фотосенсибилизатором (10^{-6} и 10^{-5} моль/л) (рис. 1а, группы

2а, 2б и 3б), происходило снижение концентрации клеток, а в случае использования МГ (10^{-4} моль/л) клетки не выявлялись (рис. 1а, группа 4). Таким образом, наибольшее модифицирующее действие на исследуемые характеристики клеток АКЭ в данных условиях оказал МГ (10^{-4} моль/л), обладающий выраженным цитотоксическим действием в темновых условиях (что выявляется в случае долговременной инкубации (24 и 48 ч)), усиливающимся в результате индукции реакций фотосенсибилизированного окисления (непосредственно после облучения красным светом и 4 ч инкубации).

Несколько иной характер носили изменения исследуемых показателей в отношении клеток АКЭ, извлеченных на 7-е сут роста неоплазмы. Рис. 2 иллюстрирует изменения уровней концентрации клеток и их жизнеспособности после фотомодификации в присутствии МГ (10^{-4} моль/л) и последующей их темновой инкубации. В данном случае на протяжении 48 ч наблюдения не выявлялось статистически значимых изменений концентрации клеток в суспензии ни при темновой инкубации с красителем, ни после фотомодификации в его присутствии (рис. 2а).

Рис. 1. Изменения концентрации (а) и уровня жизнеспособности клеток АКЭ (извлеченных на 5-е сут роста), оставшихся в суспензии к моменту анализа (б), после облучения красным светом в присутствии МГ и последующего культивирования в среде RPMI 1640 в течение 4, 24, и 48 ч: 1 — контроль (немодифицированная суспензия); а — инкубация с МГ (1 ч); б — облучение с МГ в концентрациях (моль/л): 2 — 10^{-6}; 3 — 10^{-5}; 4 — 10^{-4}; 0 — концентрация (а) и жизнеспособность (б) клеток после помещения соответствующего модифицированного образца в среду RPMI 1640, это значение принято за 100 %. По оси ординат — концентрация (С) клеток в суспензии, % (а) и уровень их жизнеспособности (А), % (б); по оси абсцисс (б) — время инкубации, ч; * — отличия от контроля статистически значимы при уровне значимости 5 %

Рис. 2. Изменения концентрации (а) и уровня жизнеспособности клеток АКЭ (извлеченных на 7-е сут роста), оставшихся в суспензии к моменту анализа (б), после облучения красным светом в присутствии МГ и последующего культивирования в среде RPMI 1640 в течение 4, 24, и 48 ч: 1 — контроль (немодифицированная суспензия); 2 — облучение (1 ч) без МГ; 3а — инкубация с МГ (10^{-4} моль/л); 3б — облучение с МГ; 0 — концентрация (а) и жизнеспособность (б) клеток после помещения соответствующего модифицированного образца в среду RPMI 1640, это значение принято за 100 %. По оси ординат — концентрация клеток в суспензии, % (а) и уровень их жизнеспособности, % (б); по оси абсцисс (б) — время инкубации, ч

Однако уровень жизнеспособности клеток при этом постепенно снижался (рис. 2б, кривые 3а и 3б) и для образцов, облученных с МГ, через 48 ч составил 29 %.

Таким образом, клетки АКЭ, извлеченные на 7-е сут роста, в указанных условиях эксперимента обнаруживали меньшую чувствительность к действию МГ (10^{-4} моль/л) как в темновых условиях, так и после фотодинамического воздействия на клетки в суспензии.

Далее нами были проведены эксперименты с использованием клеток АКЭ, находящихся в стационарной фазе роста (12-е сут). Результаты проведенных экспериментов приведены на рис. 3.

Рис. 3. Изменения концентрации (а) и уровня жизнеспособности клеток АКЭ (извлеченных на 12-е сут роста), оставшихся в суспензии к моменту анализа (б), после облучения красным светом в присутствии МГ и последующего культивирования в среде RPMI 1640 в течение 4, 24, и 48 ч (обозначения — см. на рис. 1)

В данном случае обращает на себя внимание сходный характер направленности изменений исследуемых показателей в отношении таковых образцов АКЭ, извлеченных на 5-е сут роста опухоли (в частности, аналогичное направление изменений для образцов с МГ (10^{-5} и 10^{-4} моль/л; рис. 3а, группы 3 и 4; рис. 3б, кривые 3 и 4), за исключением более резкого и генерализованного (для всех образцов, включая контрольные) снижения жизнеспособности через 4 ч культивирования и уменьшения концентрации клеток после их темновой инкубации в присутствии МГ (10^{-6} моль/л).

Таким образом, нами показано модулирующее действие МГ различных концентраций на уровень целостности клеточных мембран АКЭ как в темновых условиях, так и после фотодинамического воздействия на образцы. Кроме того, выявлена различная чувствительность опухолевых клеток на различных стадиях их пролиферации в перитонеальной полости к используемым экзогенным воздействиям.

Метиленовый голубой — производное азадифенилметанов, относящееся к классу тиазиновых красителей [1]:

МГ в условиях его фотовозбуждения является мощным генератором $^1O_2$. Это дает основание к его использованию в качестве сенсибилизатора селективного окисления синглетным кислородом биологических соединений по двойным связям. В клетке МГ, по данным разных авторов, может накапливается в митохондриях, лизосомах, ядре; обладает способностью связываться с ДНК и другими макромолекулами и низкомолекулярными соединениями. В темновых условиях в клетке краситель способен окислять восстановительные эквиваленты (НАД(Ф)Н и др.) с образованием лейкоформы, которая впоследствии вступает во взаимодействие с растворенным кислородом, в результате чего образуется пероксид водорода и восстановленный МГ. Результатом этой реакции может являться инициация цепи процессов, приводящих в конечном счете к изменениям клеточной жизнеспособности. Ранее нами было продемонстрировано модулирующее действие пероксида водорода на уровень фрагментации ДНК клеток АКЭ [7].

Клетки АКЭ различных культивируемых штаммов характеризуются различным числом хромосом [8—9]. В процессе пролиферации в перитонеальной полости животного могут происходить изменения уровня плоидности клеток, хромосомные перестройки, изменения пролиферативного индекса клеток (максимальное значение достигается на экспоненциальной стадии роста (5—7 сут), затем происходит его снижение на стационарной стадии (9—12 сут)). На рис.

Рис. 4. Клетки асцитной карциномы Эрлиха на различных стадиях клеточного цикла (7-е сут роста опухоли)

Рис. 5. Метафазные пластинки клеток асцитной карциномы Эрлиха с различным числом хромосом (7-е сут роста опухоли)

4—5 представлены микрофотографии типичных клеток АКЭ в различных фазах клеточного цикла и метафазные пластинки с различным числом хромосом на стадии интенсивной клеточной пролиферации (7-е сут). В ходе роста АКЭ по мере приближения к терминальной стадии в асцитной жидкости снижается концентрация клеток и происходит накопление их дегенеративных форм: в результате увеличения числа аномальных митозов растет количество двуядерных клеток; также наблюдается появление клеток с большой центральной вакуолью (перстневидные клетки), смещающей ядро к периферии (рис. 6). Очевидно, подобная гетерогенность клеточной популяции на различных стадиях роста АКЭ будет обусловливать их различную ответную реакцию на внешние воздействия.

Рис. 6. Клетки асцитной карциномы Эрлиха на терминальной стадии роста опухоли (двуядерные и вакуолизированные (перстневидные) клетки)

Кроме того, рост опухолевой массы в организме мышей осуществляется в условиях ее инфильтрации клетками иммунной системы, что может сказываться на изменении структурно-функциональных характеристик неоплазмы. Так, процесс пролиферации АКЭ сопровождался лейкоцитозом: происходило постепенное увеличение содержания в крови нейтрофильных лейкоцитов с инверсией лейкоцитарной формулы на терминальной стадии роста неоплазмы (16 сут), сопровождающейся лимфопенией (рис. 7).

Рис. 7. Изменения общей концентрации лейкоцитов и их отдельных популяций в крови мышей с АКЭ на различных стадиях роста опухоли: по оси ординат — концентрация клеток; по оси абсцисс — время, прошедшее после инокуляции, сут; 0 — контрольные значения показателей (до имплантации неоплазмы); * — отличия от контроля статистически значимы при уровне значимости 5 %

Изложенные факты могут являться одними из причин, определяющих неодинаковую чувствительность клеток АКЭ к действию экзогенных модификаторов. Исследованию механизмов процессов, лежащих в основе указанных явлений, будут посвящены дальнейшие наши исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications / J. P. Tardivo [et al.] // Photodiagn. and Photodynamic Therapy. — 2005. — Vol. 2. — P. 175—191.

2. “Lest we forget you — methylene blue…” / R. H. Schirmer [et al.] // Neurobiology of Aging. — 2011. — Vol. 32, Is. 12. — P. 2325.e7—2325.e16.

3. Структурно-функциональные модификации изоформ лактатдегидрогеназы под влиянием УФ-облучения и активных форм кислорода / В.Г.Артюхов [и др.] // Укр. биохим. журн. — 2001. — Т. 73, № 1. — С. 29—42.

4. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability / W. Strober // Current Protocols in Immunology. — 1997. — A.3B.1—A.3B.2.

5. Дарлингтон С.Д. Хромосомы: методы работы / Д.С. Дарлингтон, Ф.Л. Ла Кур. — М. : Атомиздат, 1980. — 182 с.

6. Макгрегор Г. Методы работы с хромосомами животных / Г. Макгрегор, Дж. Варли. — М. : Мир, 1986. — 272 с.

7. Фрагментация ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях воздействия пероксида водорода / Е.В. Духанина [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Сер.: Химия. Биология. Фармация. — 2012. — № 1. — С. 90—95.

8. Ehrlich ascites carcinoma / M. Ozaslan [et al.] // African journal of Biotechnology. — 2011. — Vol. 10. — P. 2375—2378.

9. Granzow C. A genome mutation in three related sublines of the Ehrlich — Lettré mouse ascites tumor / C. Granzow, K. Nielsen // Hereditas. — 1984. — Vol. 100. — P. 93—110.

Лысенко Юлия Александровна — канд. биол. наук, ассистент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж; e-mail: lysenko@bio.vsu.ru

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

Косых Ирина Александровна — магистрант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

Kosyh Irina A. — master’s degree student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University

Шабанов Дмитрий Игоревич — магистрант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: am7d@mail.ru

Shabanov Dmitry I. — master’s degree student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: am7d@mail.ru

Вирютина Вера Вячеславовна — студентка кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

Viryutina Vera V. — student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University

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

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