

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 57.085.23, 615.035.1

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА НА МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ КУЛЬТУР РАКОВЫХ КЛЕТОК*

И.В. Живодерников, В.П. Свеколкин, Ю.В. Саенко

Ульяновский государственный университет

В работе рассмотрено влияние противоопухолевого препарата доксорубицина на выживаемость раковых клеток линии НСТ-116 на различных стадиях клеточного цикла.

Ключевые слова: клеточный цикл, некроз, апоптоз, доксорубицин, НСТ-116.

Введение. Доксорубицин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, выделенный из культуры *Streptomyces peuceticus* var. *caesius*. Оказывает антимиотическое и антипролиферативное действие.

В основе противоопухолевого механизма действия доксорубицина лежит подавление синтеза ДНК и РНК путем интеркаляции в двойную спираль ДНК между парами азотистых оснований. Помимо этого, противоопухолевое действие, возможно, обусловлено изменением клеточных функций в результате связывания с липидами клеточных мембран и взаимодействием с топоизомеразой II [1].

Доксорубицин воздействует, таким образом, не только на опухолевые, но и на нормальные клетки тканей, поэтому обладает выраженными побочными действиями, в частности на органы сердечно-сосудистой, пищеварительной и нервной (особенно в комбинации с цисплатином) систем. При внутриартериальном введении в высоких дозах требуется экстракорпоральное выведение препарата [2].

На определенных стадиях клеточного цикла происходит репликация ДНК, репарация генетического материала, меняется активность топоизомеразы II, и согласно механизму действия доксорубицина его эффективность будет зависеть от интенсивности этих процессов [6].

Знание о том, в какой стадии клеточного цикла клетки наиболее восприимчивы к действию этого препарата, позволит снизить дозировку, а следовательно, и побочные воздействия.

Цель исследования. Сравнительное изучение чувствительности раковых клеток к доксорубицину на различных стадиях клеточного цикла.

Материалы и методы. В экспериментах использовали клеточную линию НСТ-116. Клетки культивировали при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 с 10 % фетальной коровьей сывороткой и 0,04 % гентамицином.

Синхронизацию клеточного цикла проводили с использованием двойного тимидинового блока.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли следующим образом. Клетки фиксировались 70 % холодным (-20 °С)

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации.

этанолом через каждый час после снятия двойного тимидинового блока в течение 12 ч. После фиксации клетки отмывались буфером PBS, инкубировались с РНКазой (L) в том же буфере при 37 °С в течение 30 мин, и ДНК окрашивалось при помощи пропидия иодида. Клетки фотографировались с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon-TiS. Количество клеток с признаками апоптоза и некроза оценивали через 18–24 ч после добавления доксорубина с использованием флуоресцентного микроскопа и набора реагентов для определения апоптоза V-FITC Apoptosis Kit (Biolegend). Окрашивание клеток в желтый цвет являлось признаком раннего апоптоза, в красный – некроза.

Содержание ДНК в клетках определялось по интенсивности флуоресценции и анализировалось с использованием программы ImageJ.

Клетки делились на три группы по интенсивности флуоресценции. Диапазон разброса флуоресценции пропидия иодида в клетках делился на три части следующим образом. За основу принималось минимальное значение флуоресценции (МЗФ). Значение флуоресценции меньше чем $2 \times \text{МЗФ}$ принималось в качестве количества ДНК, соответствующего фазе G1. Количество ДНК, соответствующее S-фазе клеточного цикла, соответствовало значениям МФЗ в пределах $2 \times \text{МЗФ} - 3 \times \text{МЗФ}$. Количество ДНК, соответствующее более $3 \times \text{МЗФ}$, принималось в качестве ДНК, соответствующего G2/М-фазе клеточного цикла. В результате были установлены промежутки времени между фазами клеточного цикла: между S-фазой и G2/М-фазой – 4 ч, между G2/М-фазой и G1-фазой – 2 ч (рис. 1).

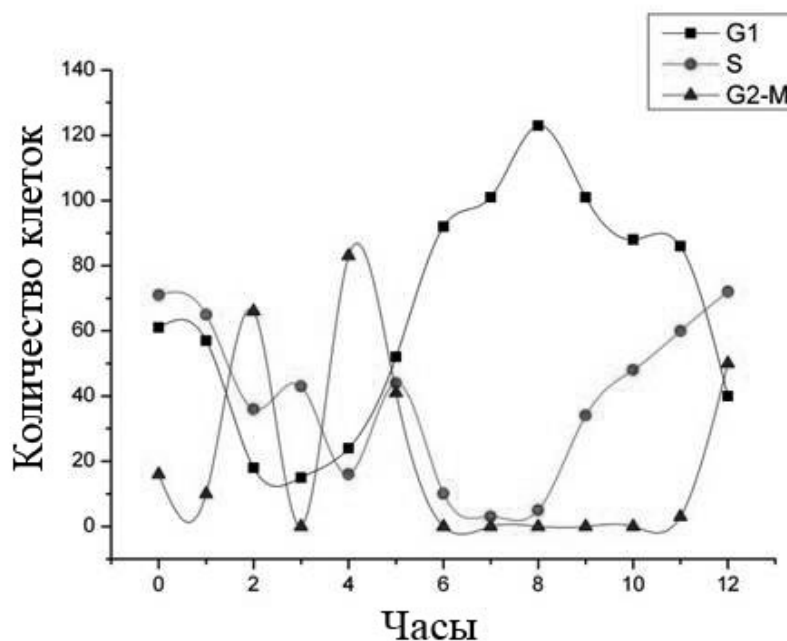


Рис. 1. Распределение клеток по фазам клеточного цикла во времени

Доксорубин добавляли сразу после удаления тимидина из ростовой среды, через 240 мин и 360 мин, что соответствовало нахождению клеток в S-, G2/М- и G1-фазах. Инкубацию клеток с доксорубином проводили в течение 1 или 24 ч.

Все эксперименты и определения параметров были выполнены как минимум с трехкратным повторением. Результаты выражались как $M \pm SD$. Результаты обработаны

статистически с использованием критерия t Стьюдента для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен результат синхронизации клеточного деления – количество клеток в каждой из фаз клеточного цикла через равные промежутки времени после снятия двойного тимидинового блока.

После инкубации с доксорубицином в течение 1 ч мы не наблюдали отличий от контрольной группы (рис. 2).

В ходе инкубации клеток с доксорубицином в течение 24 ч максимальное число апоптотических и некротических клеток наблюдалось в фазе S клеточного цикла (рис. 3).

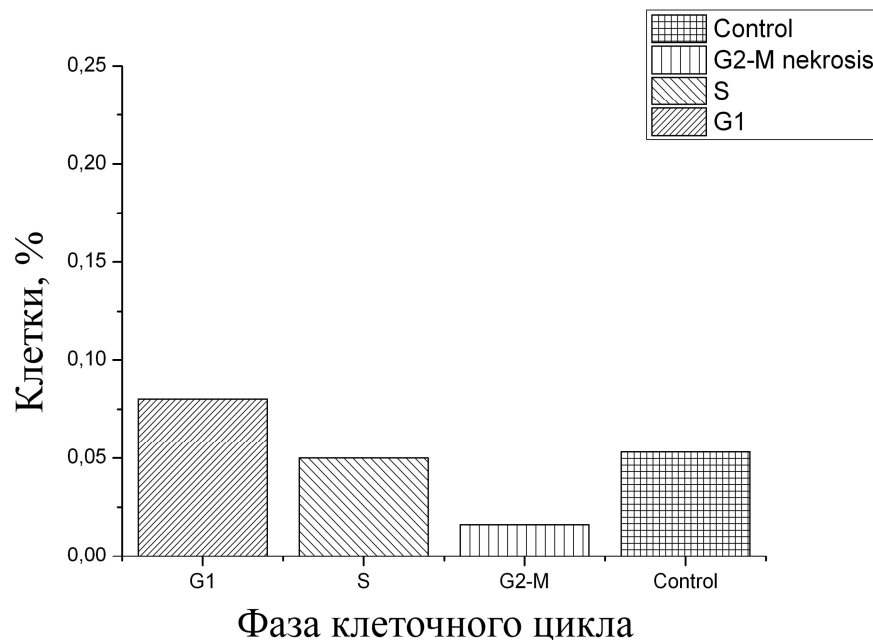


Рис. 2. Доля некротических клеток на каждой стадии клеточного цикла после 1 ч инкубации с доксорубицином

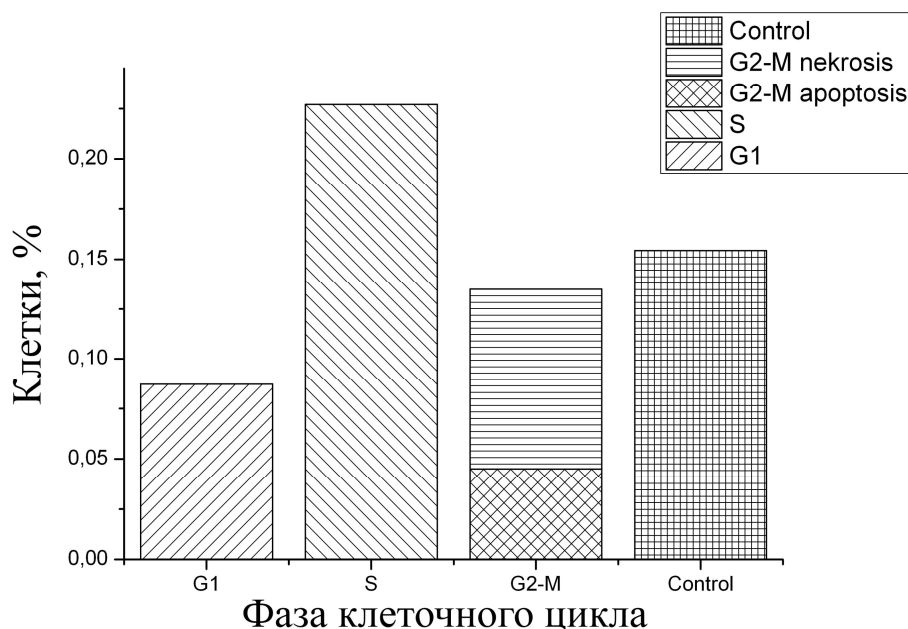


Рис. 3. Доля некротических клеток на каждой стадии клеточного цикла после 24 ч инкубации с доксорубицином

Мы предполагаем, что доксорубицин может индуцировать репарационные механизмы в раковых клетках. Низкое количество апоптотических и некротических клеток при

одночасовой инкубации связано с коротким промежутком времени воздействия препарата. Известно, что при повреждении генетического аппарата опухолевых клеток цитоста-

тическими препаратами включается ряд репаративных систем в зависимости от характера повреждения (например, гомологичная рекомбинация или негомологичное слияние концов одиночных или двойных разрывов ДНК с участием таких ферментов, как ДНК-зависимая протеинкиназа, киназы АТМ и АТР, которые взаимодействуют с большим количеством субстратов, опосредующих репаративные процессы ДНК). При этом экспрессия генов, участвующих в репарации, происходит таким образом, чтобы не индуцировать продвижение клеток по клеточному циклу, что обеспечивает защиту от апоптоза. Изменения регуляции репаративных процессов в целом позволяют опухолевой клетке относительно быстро восстанавливать разрывы и другие повреждения ДНК. Высокая выживаемость опухолевых клеток при одночасовой инкубации может быть обусловлена активацией системы транспортных белков, таких как транспортеры ABCB1 (Р-гликопротеин, MDR1), ABCG2 (MXR/BCRP1), ABCC1 (MRP1), выводящих из клетки вещества экзогенного происхождения [4, 5]. Эти белки обладают широкой субстратной специфичностью. Цитохром Р450, являясь основным каталитическим элементом монооксигеназной ферментной системы, обеспечивает включение атома кислорода в структуру липофильного соединения, которое может быть более химически активным и токсичным, но легче выводится из организма [5]. Важно подчеркнуть, что, как и в случае мультитранспортеров, цитохром Р450 неспецифически взаимодействует с большим количеством экзогенных субстратов и тем самым способствует их

выведению из клетки [3]. Инкубации в течение одного часа может быть недостаточно и для полноценной диффузии доxorубина через плазмалемму.

Выводы:

1. Выживаемость синхронизированных раковых клеток линии НСТ-116 не зависит от фазы клеточного цикла, в которой был добавлен доxorубин, при кратковременном воздействии доxorубина (1 ч).

2. При долговременной инкубации клеток линии НСТ-116 наибольшая смертность наблюдалась при добавлении доxorубина к синхронизированным клеткам в S-стадии клеточного цикла.

1. *Переводчикова Н. И.* Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Н. И. Переводчикова. – М.: Практическая медицина, 2011. – 512 с.

2. *Самуилов В. Д.* Программированная клеточная гибель / В. Д. Самуилов, А. В. Алескин, Е. М. Лагунова // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 8. – С. 1–12.

3. *Свирновский А. И.* Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы / А. И. Свирновский // Мед. новости. – 2008. – № 13. – С. 7–19.

4. *Dai C. L.* Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2 / C. L. Dai, Y. J. Liang, Y. S. Wang // Cancer Lett. – 2009. – Vol. 279, № 1. – P. 74–83.

5. *Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System* / B. Sarcadi [et al.] // Physiol. Rev. – 2006. – Vol. 86. – P. 1179–1236.

6. *The Biological Basis of Cancer* / R. G. McKinnell [et al.]. – Cambridge University Press, 1998. – 378 p.

EFFECT OF DOXORUBICIN ON CELL DEATH IN SYNCHRONIZED CELL CULTURES

I.V. Zivodernikov, V.P. Svekolkina, Y.V. Saenko

Ulyanovsk State University

In this paper was assayed the influence of anticancer drug doxorubicin on survival of cancer cell line HCT-116 at various stages of the cell cycle.

Keywords: cell cycle, apoptosis, necrosis, doxorubicin, HCT-116.