

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT

Наталья Владимировна Рязанцева, Елена Алексеевна Степовая, Елена Валерьевна Коновалова, Ольга Леонидовна Носарева*, Анастасия Ивановна Наумова, Дмитрий Сергеевич Орлов, Оксана Николаевна Веснина, Вячеслав Викторович Новицкий

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Реферат

Цель. Экспериментальный подбор оптимальной концентрации водорода пероксида, способной эффективно индуцировать развитие окислительного стресса и запуск программированной гибели максимального количества лимфоцитов крови, но не их элиминацию по пути некроза.

Методы. Объектом исследования служила опухолевая клеточная линия Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), и лимфоциты, выделенные из крови здоровых доноров (15 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 18 до 25 лет. Для подтверждения объекта исследования (лимфоциты крови) использовали типирование изучаемых клеток по CD5 при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Для моделирования окислительного стресса *in vitro* лимфоциты крови инкубировали в присутствии водорода пероксида в конечной концентрации 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 мМ. Оценивали содержание восстановленного и окисленного глутатиона, соотношение между этими фракциями, а также уровень активных форм кислорода в лимфоцитах крови для сравнительной оценки степени окислительного стресса с опухолевыми клетками.

Результаты. Установлена оптимальная конечная концентрация водорода пероксида – 0,5 мМ. При ней зарегистрированы нарастание концентрации активных форм кислорода в клетке, сопоставимое с уровнем в опухолевых клетках, образование максимального количества аннексин-положительных клеток и минимальное пропидий-положительных, сопоставимое значение соотношения восстановленного глутатиона к окисленному.

Вывод. Подобрана оптимальная концентрация водорода пероксида (0,5 мМ) для формирования окислительного стресса в лимфоцитах крови с целью изучения дизрегуляции апоптоза при окислительном стрессе в опухолевых клетках линии Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека).

Ключевые слова: апоптоз, окислительный стресс, опухолевый рост, экспериментальная модель.

OXIDATIVE STRESS MODELING IN THE BLOOD LYMPHOCYTES IN VITRO TO EXAMINE THE JURKAT LINE TUMOR CELLS APOPTOSIS N.V. Ryazantseva, E.A. Stepovaya, E.V. Konovalova, O.L. Nosareva, A.I. Naumova, D.S. Orlov, O.N. Vesnina, V.V. Novitsky. *Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.* **Aim.** To experimentally select the optimum concentration of hydrogen peroxide capable of efficiently induce oxidative stress and launch the programmed death of the maximum number of lymphocytes, but not induce the necrosis. **Methods.** Jurkat tumor cell line (human T-lymphoblastic leukemia) lymphocytes isolated from the blood of healthy donors (15 males, 18 females) aged 18 to 25 years were the objects of the study. To confirm the object of study, blood cells typing for CD5 using flow cytometry was performed. To model the oxidative stress *in vitro*, blood lymphocytes were incubated in the presence of hydrogen peroxide at a final concentration of 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 mM. Reduced and oxidized glutathione levels estimation, the ratio between the fractions, and the level of reactive oxygen forms in lymphocytes for a relative assessment of the oxidative stress degree in cancer cells, were used. **Results.** An optimal final concentration of hydrogen peroxide – 0.5 mM – was established, causing an increase of active oxygen forms concentration in cells, comparable to levels in tumor cells, the formation of a maximum number of annexin positive cells and minimum number propidium-positive cells and the comparable ratio of the reduced and oxidized glutathione levels. **Conclusion.** The optimum concentration of hydrogen peroxide (0.5 mM) was selected for the oxidative stress formation in the peripheral blood lymphocytes to study the apoptosis dysregulation in oxidative stress in Jurkat line tumor cells (human T-lymphoblastic leukemia). **Keywords:** apoptosis, oxidative stress, tumor growth, experimental model.

Окислительный стресс – составная часть патогенеза многих заболеваний, таких как ишемическое и реперфузионное повреждение тканей, воспалительные процессы, сосудистые нарушения, атеросклероз, нейродегенеративные и онкологические заболевания, а также процессы адаптации и старения [4]. Активные формы кислорода (АФК) участвуют в прямом повреждении дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), могут нарушать процессы апоптоза, редокс-баланс, регуляцию путей передачи клеточных сигналов и др. [15].

На сегодняшний день онкологические заболевания занимают второе место по смертности после сердечно-сосудистых заболеваний

[8]. Присущая опухолевой трансформации дизрегуляция летальной программы клеток обусловлена изменением соотношения про- и антиапоптогенных белков, возникающим в результате последовательной активации редокс-зависимых элементов сигнальной трансдукции различными факторами как внутри-, так и внеклеточного происхождения, приводящими к изменению окислительно-восстановительного баланса клетки и адекватного функционирования различных систем [9]. Несмотря на многочисленные исследования в области идентификации молекулярных мишеней для регулирования процесса гибели клеток при опухолевом росте [6, 7, 11–13], на данный момент вопрос остаётся открытым. Значительную долю в этой области занима-

Адрес для переписки: olnosareva@yandex.ru

ют исследования, направленные на изучение активации апоптоза опухолевых клеток. Для объяснения молекулярных механизмов реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток необходимо учитывать изменение в системе глутатиона. Восстановленный глутатион не только способен снижать деструктивное и цитотоксическое действие АФК при опухолевой трансформации, но и участвовать в передаче внутриклеточных сигналов, редокс-регуляции транскрипционных факторов, экспрессии генов и активности процессов, приводящих к апоптозу [5, 9].

Для исследования участия окислительного стресса при различных патологических процессах применяют методы моделирования данного состояния как *in vitro*, так и *in vivo* [2]. Одним из способов индукции апоптоза служит воздействие водорода пероксида на изучаемые клетки [1].

Отсутствие данных литературы об особенностях реагирования системы глутатиона в лимфоцитах крови в зависимости от концентрации водорода пероксида *in vitro*, разнообразие способов индикации фенотипических проявлений апоптоза и некроза в исследованиях различных авторов определили цель исследования — экспериментальный подбор оптимальной концентрации H_2O_2 , способной эффективно индуцировать развитие окислительного стресса и запуск программированной гибели максимального количества лимфоцитов крови, но не их элиминацию по пути некроза.

В качестве объекта исследования была использована опухолевая клеточная линия Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), полученная из Российской коллекции клеточных культур института цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург), а также лимфоциты, выделенные из крови здоровых доноров (15 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 18 до 25 лет.

Культирование опухолевых клеток линии Jurkat проводили суспензионным методом в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин («Вектор-Бест», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США) при температуре 37 °С и в 5% атмосфере CO_2 . Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста и пересаживали через 3 сут.

Первоначально из венозной крови выделяли мононуклеарные клетки путём центрифугирования на градиенте «Ficoll-Paque» («Pharmacia», Швеция, $\rho=1,077$ г/см³) [10], далее на градиенте «Перколл» («Sigma», США, $\rho=1,130$ г/см³) выделяли лимфоциты [14]. Затем полученные клетки культивировали с H_2O_2 при 37 °С и 5% CO_2

в течение 1 ч в полной питательной среде RPMI-1640. Добавление H_2O_2 в конечных концентрациях 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 мМ инициировало окислительный стресс.

Для подтверждения объекта исследования (Т-лимфоциты крови) использовали типирование изучаемых клеток по CD5 при помощи метода проточной цитофлуориметрии и с использованием анти-CD5, меченых флюоресцеином изотиоцианатом (FITC) («BD Pharmingen™», США). Для изотипического контроля применяли подкласс иммуноглобулинов IgG1-FITC («BD Pharmingen™», США).

Для сравнительной оценки степени окислительного стресса между опухолевыми клетками и лимфоцитами крови исследовали уровень АФК и отношение восстановленного глутатиона к окисленному. Уровень восстановленного и окисленного глутатиона определяли методом, предложенным М.Е. Anderson (1985) в модификации Kojima S. и соавт. (2004). Определение концентрации внутриклеточных АФК проводили с помощью дихлорфлюоресцеина диацетата методом проточной цитофлуориметрии. В основе метода лежит способность дихлорфлюоресцеина диацетата (изначально не флюоресцирующего) пассивно проникать внутрь клетки и под действием эстераз переходить в полярное соединение, не способное диффундировать обратно из клетки, которое после реакции с H_2O_2 превращается во флюоресцирующий метаболит.

Определение количества аннексин- и пропидия йодид-положительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидия йодида («Beckman Coulter», Франция). Метод основан на способности аннексина V специфически связываться с фосфатидилсеринном, экспрессированным на внешней стороне цитоплазматической мембраны, что указывает на возможность вступления клетки в апоптоз или воспринимается как сигнал к фагоцитозу. Молекулы же пропидия йодида (PI) способны проникать в повреждённые клетки и интеркалировать с дефрагментированной ДНК при некрозе клеток.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Далеко не для всех типов клеток подобраны оптимальные условия воссоздания окислительного стресса, в современной литературе отсутствуют данные об изменении метаболизма лимфоцитов крови под воздействием различных концентраций H_2O_2 *in vitro*. Оптимальным индикатором степени формирования окисли-

Таблица 1

Уровень исследованных показателей в лимфоцитах крови при различных условиях культивирования и опухолевых клетках линии Jurkat [Ме (Q₁-Q₃)]

	Клеточная линия Jurkat	Конечная концентрация H ₂ O ₂ в культуральной среде лимфоцитов крови, мМ			
		0,3	0,5	1	2
Количество аннексин-положительных клеток, %	3,50 [2,70-4,20]	36,05 [21,05-37,09]*	67,90 [53,09-69,34]*	15,04 [12,78-19,34]*	7,56 [6,09-11,98]*
Количество пропидий йодид-положительных клеток, %	0,35 [0,15-0,45]	6,98 [3,67-7,90]*	7,22 [6,45-8,09]*	44,44 [37,67-47,01]*	67,98 [43,20-82,23]*
Активные формы кислорода, у.е.	0,65 [0,49-1,98]	0,45 [0,34-0,65]	0,71 [0,57-1,92]	0,81 [0,78-1,23]	1,56 [1,43-1,89]
GSH/GSSG, у.е.	13,14 [11,36-14,23]	13,50 [13,45-13,81]	12,46 [10,71-12,78]	17,48 [14,96-22,95]*	7,04 [5,36-10,96]*

Примечание: * p < 0,05 по сравнению с показателями опухолевой линии Jurkat.

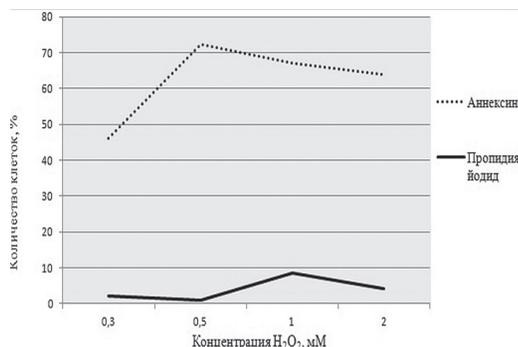


Рис. 1. Влияние различных концентраций H₂O₂ на содержание аннексин-положительных и пропидий-положительных лимфоцитов крови.

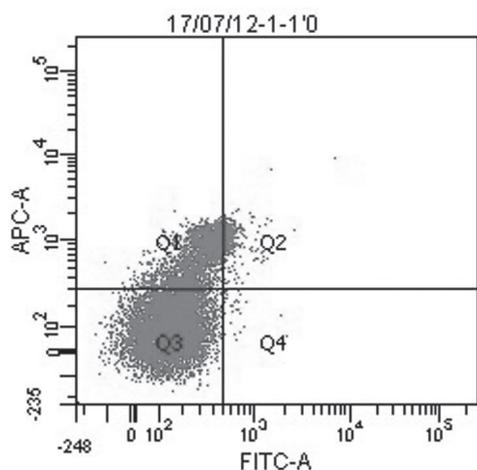


Рис. 2. Конечная концентрация водорода пероксида 1 мМ; FITC – флюоресцеин изотиоцианат; APC – аллофикоцианин; А – канал на проточном цитофлуориметре; Q1 – аннексин V-FITC-; пропидия йодид+; Q2 – аннексин V-FITC+; пропидия йодид+; Q3 – аннексин V-FITC-; пропидия йодид-; Q4 – аннексин V-FITC+; пропидия йодид-.

тельного стресса служит интегральный показатель – отношение восстановленного глутатиона к окисленному [3].

Для моделирования окислительного стресса *in vitro* лимфоцитов крови, полученных от здоровых доноров, клетки инкубировали в присутствии H₂O₂ в конечной концентрации 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 мМ.

В результате проведенного нами исследования было установлено, что максимальный уровень содержания АФК приходится на группу клеток, культивируемых с H₂O₂ в конечной концентрации 2 мМ. При этих же условиях инкубирования определили самый низкий показатель отношения восстановленного глутатиона к окисленному (табл. 1). Однако следует учитывать, что данная модель разрабатывалась для изучения дизрегуляции апоптоза в условиях окислительного стресса в опухолевых клетках линии Jurkat. Таким образом, было необходимо не только определить наилучшие условия для моделирования окислительного стресса в клетке, но также сравнить их с соответствующими показателями в опухолевых клетках.

Выявлено, что оптимальной конечной концентрацией H₂O₂ является 0,5 мМ. Данная концентрация вызывает нарастание образования АФК в лимфоцитах крови здоровых доноров, сопоставимое с уровнем в опухолевых клетках, а также индуцирует максимальное количество аннексин-положительных клеток, минимальное пропидий йодид-положительных и сопоставимое значение интегрального показателя отношения восстановленного глутатиона к окисленному (см. табл. 1, рис. 1-6).

ВЫВОД

В целом среди изученных нами концентраций H₂O₂ для индукции в культуре лимфоцитов крови окислительного стресса *in vitro*,

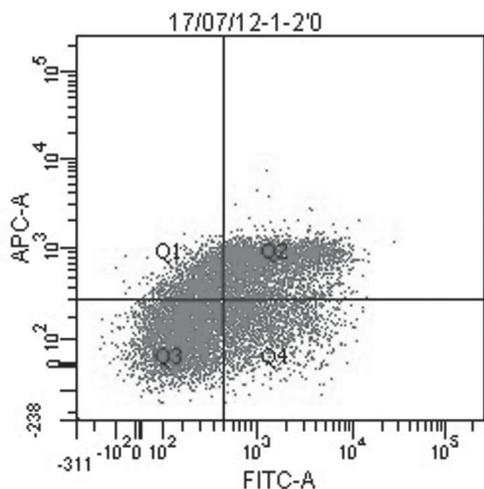


Рис. 3. Конечная концентрация водорода пероксида 2 мМ; FITC – флюоресцеин изотиоцианат; APC – аллофикоцианин; А – канал на проточном цитофлуориметре; Q1 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид+; Q2 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид+; Q3 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид-; Q4 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид-.

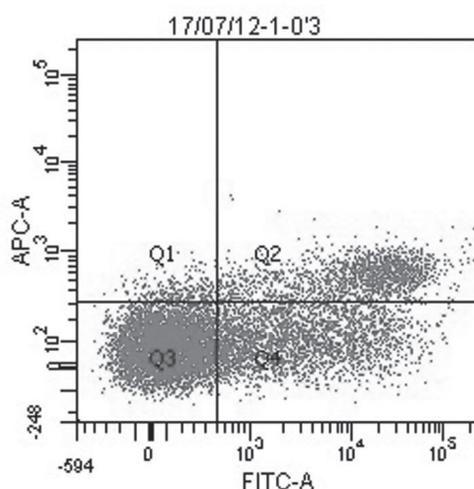


Рис. 4. Конечная концентрация водорода пероксида 0,3 мМ; FITC – флюоресцеин изотиоцианат; APC – аллофикоцианин; А – канал на проточном цитофлуориметре; Q1 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид+; Q2 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид+; Q3 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид-; Q4 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид-.

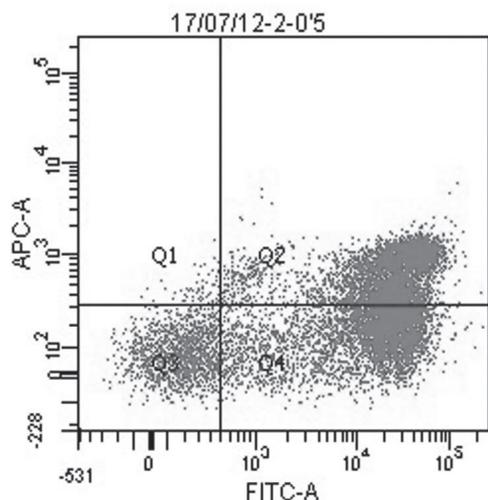


Рис. 5. Конечная концентрация водорода пероксида 0,5 мМ; FITC – флюоресцеин изотиоцианат; APC – аллофикоцианин; А – канал на проточном цитофлуориметре; Q1 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид+; Q2 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид+; Q3 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид-; Q4 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид-.

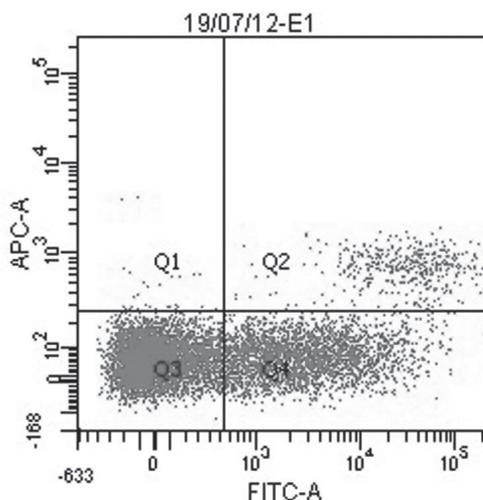


Рис. 6. Конечная концентрация опухолевых клеток линии Jurkat; FITC – флюоресцеин изотиоцианат; APC – аллофикоцианин; А – канал на проточном цитофлуориметре; Q1 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид+; Q2 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид+; Q3 – аннексин V-FITC-; пропидия иодид-; Q4 – аннексин V-FITC+; пропидия иодид-.

способствующего вступлению в апоптоз максимального количества клеток, оптимальна концентрация 0,5 мМ, поскольку при этом не активируются процессы некротической гибели и создаются условия, позволяющие с наибольшей вероятностью воспроизвести внутриклеточный уровень активных форм кислорода, характерный для опухолевых клеток.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.» а также в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ

ЛИТЕРАТУРА

1. *Архипов С.А., Шкурупий В.А., Зайковская М.В. и др.* Разноправленные эффекты H_2O_2 на макрофаги и фибробласты в условиях моделирования окислительного стресса // Современ. наукоёмк. технол. — 2010. — №8. — С. 76–77.
2. *Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В.* Окислительная модификация протеинов, её роль при патологических состояниях // Украин. биохим. ж. — 2008. — Т. 80, №6. — С. 5–18.
3. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Глутатион ядра клетки и его функции // Вопр. биол., мед. и фармацевт. хим. — 2010. — №5. — С. 3–5.
4. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др.* Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. — Новосибирск: АРГА, 2008. — 284 с.
5. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. — 2007. — Т. 72, вып. 2. — С. 158–174.
6. *Рязанцева Н.В., Жаворонок Т.В., Степовая Е.А. и др.* Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний // Бюлл. СО РАМН. — 2010. — Т. 30, №5. — С. 58–63.
7. *Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В. и др.* Митоген-активированные протеинкиназы JNK и p38 являются редокс-зависимыми молекулярными мишенями нарушения апоптоза при окислительном стрессе // Успехи физиол. наук. — 2009. — Т. 40, №2. — С. 3–11.
8. *Чиссова В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Злокачественные новообразования в России в 2011 г. (заболеваемость и смертность). — Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2013. — 289 с.
9. *Aslan M., Canatan D.* Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients // Exp. Hematol. — 2008. — Vol. 36, N 11. — P. 1535–1544.
10. *Bignold L.P., Ferrante A.* Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method // J. Immunol. Methods. — 1987. — Vol. 96, N 1. — P. 29–33.
11. *Cui J., Wang Q., Wang J. et al.* Basal c-Jun NH2-terminal protein kinase activity is essential for survival and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells // Mol. Cancer Ther. — 2009. — Vol. 8, N 12. — P. 3214–3222.
12. *Gibot L., Follet J., Metges J.P. et al.* Human caspase 7 is positively controlled by SREBP-1 and SREBP-2 // Biochem. J. — 2009. — Vol. 27, N 3. — P. 473–483.
13. *Negróni L., Samson M., Guignon J.M. et al.* Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation // Mol. Cancer Ther. — 2007. — Vol. 10. — P. 2747–2756.
14. *Ulmer A.J., Flad H.D.* Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium // J. Immunol. Methods. — 1979. — Vol. 30, N 1. — P. 1–10.
15. *Valko M., Rhodes C.J., Moncol J. et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // Chem. Biol. Interact. — 2006. — Vol. 160. — P. 1–40.

УДК 612.122: 612.441: 612.018: 612.084: 613.81: 616.89-008.441.13: 618.3

НО24

ГОРМОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У ПРЕНАТАЛЬНО АЛКОГОЛИЗИРОВАННОГО ПОТОМСТВА КРЫС

Наталья Львовна Самусева, Наталья Михайловна Курч, Валерий Евгеньевич Высокогорский*

Омская государственная медицинская академия

Реферат

Цель. Выявление роли гормональных нарушений в развитии гипогликемии при воздействии пренатальной алкогольной интоксикации у крыс.

Методы. Изучали влияние пренатальной алкогольной интоксикации на регуляцию метаболизма углеводов у потомства крыс в возрасте 15, 30 и 60 сут. С этой целью самкам белых беспородных крыс интрагестально вводили 40% раствор этанола в дозе 4 г/кг во время периода гестации. В плазме крови определяли концентрацию глюкозы, уровень инсулина, глюкагона, кортизола, содержание гормонов щитовидной железы.

Результаты. У потомства, алкоголизированного в пренатальном периоде, выявлено увеличение концентрации инсулина в крови в возрасте 30 и 60 сут, снижение концентрации глюкагона в возрасте 60 сут. Данные изменения сопровождалась стойкой гипогликемией. Концентрация кортизола в плазме крови пренатально алкоголизированных крыс не имела статистически значимых различий со значениями контрольной группы. Также установлено статистически значимое снижение концентрации трийодтиронина в возрасте 60 сут на фоне увеличения содержания в крови тироксина.

Вывод. Полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии пренатальной алкогольной интоксикации на процессы регуляции метаболизма углеводов в отдалённые сроки постнатального периода: установлено развитие разнонаправленных изменений уровня инсулина, глюкагона и тиреоидных гормонов в крови потомства, сохраняющихся в отдалённые периоды постнатального онтогенеза, что может играть немаловажную роль в развитии гипогликемии, а также определять высокий уровень мертворождённости и ранней постнатальной летальности.

Ключевые слова: пренатальная алкогольная интоксикация, гипогликемия, инсулин, глюкагон, тиреоидные гормоны.

Адрес для переписки: nlsam@mail.ru