

Исследование цитотоксического действия антиоксидантного комплекса из куколок дубового шелкопряда на культуры трансформированных клеток

А.А. Чиркин*, О.Ю. Абакумова**, Т.А. Толкачева*, С.С. Стугарева*

*Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

**Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича», Москва

Выделены три фракции гемолимфы с помощью колоночной хроматографии на сефадексе G25 fine. Использовали среднюю группу фракций (10–32), содержащих пептиды, для оценки ее цитотоксичности. Для этого культивировали культуры нормальных фибробластов человека, а также ряд трансформированных клеток, в присутствии фракций гемолимфы, содержащей пептиды. Установлено, что фракции 18–22 подавляли рост клеток гепатомы Нер G2, иммортализованных аденовирусом 5 типа эмбриональных клеток почек человека 29 ЗТ и клеток карциномы молочной железы MCF7. Рост клеток невриномы гассерова узла крысы НГУК1 и клеток карциномы шейки матки HeLa частично ингибировали фракции 10–13. Выявлены эффекты стимуляции роста клеток *in vitro* фракциями гемолимфы, расположенными рядом с фракциями, ингибирующими рост трансформированных клеток. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток рост фибробластов не подавлялся, а даже усиливался компонентами фракций 19 и 20. Кроме того, активировали рост фибробластов также компоненты фракций 31 и 32.

Ключевые слова: дубовый шелкопряд, культивирование клеток, цитотоксичность, трансформированные клетки.

Investigation of the cytotoxic effect of antioxidant complex of oak silkworm pupae on cultures of the transformed cells

A.A. Chirkin*, O.Yu. Abakumova**, T.A. Tolkacheva*, S.S. Stugareva*

*Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

**State Institution «Research Institute of Biomedical Chemistry RAMS named after V.N. Orekhovich», Moscow

Three fractions of haemolymph were obtained by column chromatography on Sephadex G25 fine. We investigated the middle group of fractions (10–32), containing peptides, to evaluate its cytotoxicity. To do this, we cultured normal human fibroblast cultures, as well as a number of transformed cells in the presence of hemolymph fractions containing peptides. It was established that the fractions 18–22 inhibited the growth of hepatoma cells Hep G2, immortalized with adenovirus type 5 human embryonic kidney cells 29 ZT and breast cancer cell MCF7. Neurooma cell growth of Gasser node cells and rat RGGN1 cervical carcinoma HeLa partially inhibited fraction 10–13. We found out effects of stimulation of cell growth *in vitro* fractions of hemolymph, located next to the fractions that inhibit the growth of transformed cells. In contrast to the action of most studied cultures of transformed cells, the growth of fibroblasts is not inhibited, and even amplified by the components of fractions 19 and 20. In addition, we activated fibroblasts and growth components of fractions 31 and 32.

Key words: oak silkworm, the cultivation of cells, cytotoxicity, transformed cells.

Гемолимфа куколок образуется в процессе гистолиза тканей гусеницы. В конце диапаузы из компонентов гемолимфы должен образоваться новый эукариотический организм – бабочка. Поэтому в процессе диапаузы в гемолимфе куколок следует ожидать смены ингибирующего биосинтезы действия на активизирующее их. Такой механизм вполне реален, поскольку гемолимфа куколок содержит ряд биологически активных веществ и обладает антиоксидантной, иммуномодулирующей, бактерицидными активностями. Ранее было показано, что

в гемолимфе куколок в начале диапаузы содержатся вещества, стимулирующие апоптоз в клетках гемолимфы, а также в мезенхимальных стволовых клетках крысы [1–3]. Следует предположить, что за ингибирующие и активизирующие активности отвечают разные компоненты гемолимфы, поэтому целесообразен их поиск в ее различных фракциях.

Целью работы было исследование влияния отдельных фракций гемолимфы на наличие цитотоксического действия, а также на процессы синтеза белков и нуклеиновых кислот в культурах нормальных и трансформированных клеток.

Материал и методы. Для разделения гемолимфы куколок дубового шелкопряда использовали колонку диаметром 2,5 см и объемом 130 мл, заполненную сефадексом G25 fine, уравновешенную 0,01 М NH_4HCO_3 . Предварительно сефадекс с достаточным количеством воды кипятили в течение 30 мин, затем отмучивали для удаления мелких частиц. Для фракционирования на колонке с сефадексом G25 fine содержимое куколок шелкопряда помещали в 10 мл 0,9% раствора NaCl (для предотвращения окисления) и гомогенизировали путем размешивания на магнитной мешалке 10 мин. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин. В центрифужных пробирках получали 3 слоя: жироподобное вещество в верхней части пробирки, надосадочную жидкость и осадок на дне пробирки. После удаления жирового слоя и снятия надосадочной жидкости к осадку добавляли еще раз 10 мл 0,9% раствора NaCl, проводили гомогенизацию и центрифугирование. Затем 2,5 мл надосадочной жидкости пропускали через хроматографическую колонку, заполненную Sephadex G25 fine. Использовали для элюции 0,01 М NH_4HCO_3 . Собирали фракции объемом 3 мл со скоростью 3 мин/фракция. Анализ элюатов (пробирки 1-53) проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм. Ориентировочно рассчитывали концентрацию во фракциях белков (пептидов) по формуле $1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} = \text{мг белка в мл пробы}$ (A – экстинкция при данной длине волны).

Материал фракций использовали для определения цитотоксической активности в опытах *in vitro* в культуре клеток [4–5]. Линии клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Skov 3 (аденокарцинома яичника), Hep G2 (гепатокарцинома) были получены из American Type Culture Collection (США), НГУК-1 (невринома Гассерова узла крысы) – из коллекции НИИ морфологии человека РАМН. Фибробласты кожи здоровых людей (ФБЧ), которые использовали в эксперименте только на 2–8 пассажах, были получены из лаборатории биотехнологии ММУ им. Н.М. Сеченова. Остальные линии клеток брались из коллекции НИИ БМХ им. В.Н. Ореховича РАМН. Культивирование клеток производили во влажной атмосфере (5% CO_2 , 37°C). Использовали среды DMEM, RPMI 1640, а также термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и лошадиную сыворотку (ЛС) фирмы «Gibco» США. Среда инкубации содержала 10% ЭТС, а при культивировании ФБЧ в среду дополнительно

добавляли 5% ЛС. Среда содержала 2 мМ глутамина, антибиотики пенициллин и стрептомицин 10 ед/мл и 10 мкг/мл, соответственно (фирма «Панэко»).

Для определения цитотоксической активности фракций гемолимфы клетки пассировали (100 мкл/лунку) в 96-ти луночные планшеты с плотностью $2,5 \times 10^3$ клеток/лунку, за исключением НГУК1 (5×10^3 клеток/лунку). Клетки преинкубировали в планшетах (Costar) в течение 24 часов для их адаптации перед добавлением фракций гемолимфы. Все эксперименты по культивированию клеток проводили в 4-х повторностях. В лунки помещали по 15 мкл фракций гемолимфы. Инкубацию проводили 48 или 72 часа.

В конце инкубации оценивали цитотоксичность с помощью МТТ-теста. Реактив МТТ (ДиаЭм, Германия) представляет собой тиазоль синий тетразолий бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-3,5-дифенилформазан). Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только метаболически активных клеток конвертируют МТТ в окрашенные кристаллы формазана. Для проведения МТТ-теста к культивируемым клеткам добавляли 10 мкл 0,5%-ного раствора МТТ. Затем клетки культивировали еще 3 часа при 37°C. После удаления культуральной среды кристаллы формазана растворяли в 0,1 мл DMSO при встряхивании на Titramax 101 в течение 10 мин. Суспензию клеток переносили в 96-ти луночные планшеты с коническим дном и осаждали в центрифуге Eppendorf 5810 R при 1000 g 5 мин. Супернатанты удаляли, а осадки растворяли в 0,1 мл DMSO при встряхивании планшетов в течение 10 мин. Затем окрашенные растворы переносили согласно номерам проб в те 96-ти луночные планшеты с плоским дном, в которых проводили реакцию МТТ-теста. После их встряхивания в течение 10 мин измеряли оптическую плотность растворов на мультискане EX (Lab. System, Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывали в процентах от контроля, которым являлись клетки, культивированные без добавления фракций гемолимфы.

Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты представлены в виде графиков.

В результате хроматографии на колонке с сефадексом G25 fine получены более 50 фракций, в которых, судя по величинам поглощения

при 210, 260 и 280 нм, содержатся три группы веществ: полимеры (возможно, белки и нуклеопротеины), пептиды и низкомолекулярные биорегуляторы (рис. 1). Пептиды находятся во фракциях 10–32.

При анализе распределения сульфгидрильных групп и восстановленного глутатиона оказалось, что они распределяются в области первого и второго пиков. Поскольку глутатион трипептид, можно предположить, что такие короткие пептиды локализуются во фракциях 18–24 (рис. 2).

Поэтому в дальнейших исследованиях производился анализ биологического действия пептидных фракций гемолимфы.

На первом этапе исследования было изучено цитотоксическое действие фракций гемолимфы на рост трансформированных клеток. Наиболее убедительные результаты были получены при изучении влияния пептидсодержащих фракций гемолимфы на рост клеток гепатомы: фракции 18–22 подавляли рост клеток. Этот эффект был выявлен как при использовании МТТ-теста, так и окраски кристаллвиолетом (рис. 3).

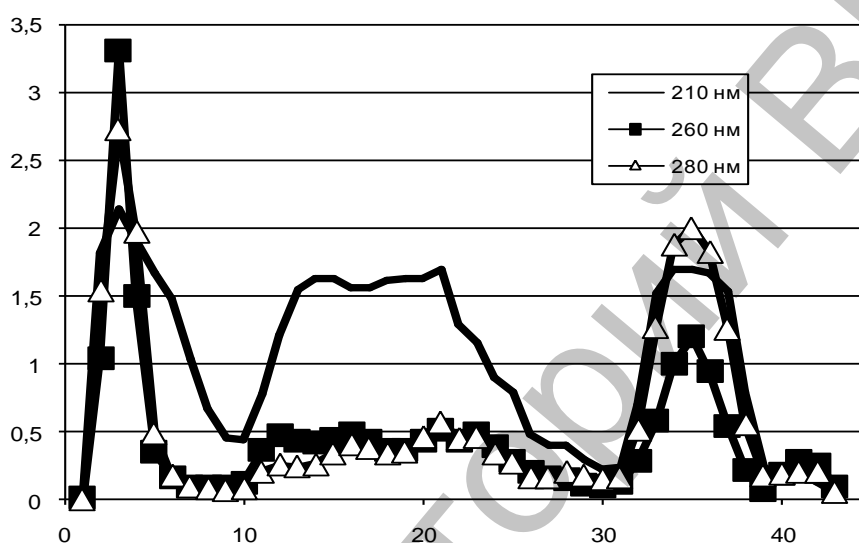


Рис. 1. Распределение оптических плотностей во фракциях гемолимфы.

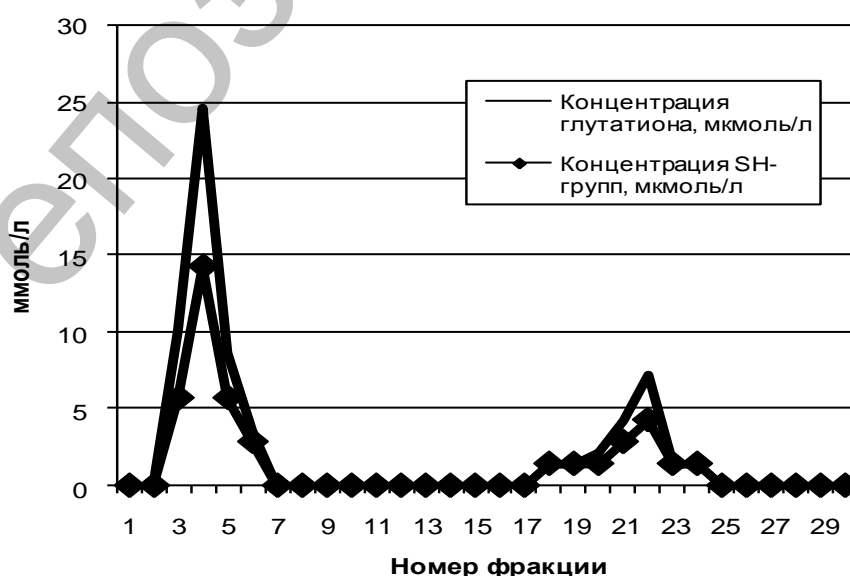


Рис. 2. Распределение SH-групп и восстановленного глутатиона во фракциях гемолимфы.

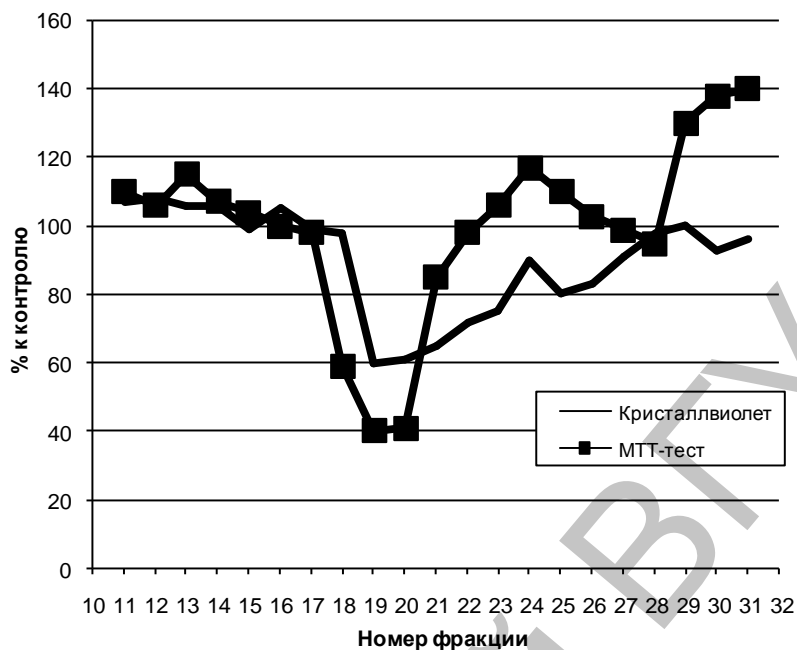


Рис. 3. Рост клеток Нер G2 через 48 ч после инкубации с пептид-содержащими фракциями гемолимфы.

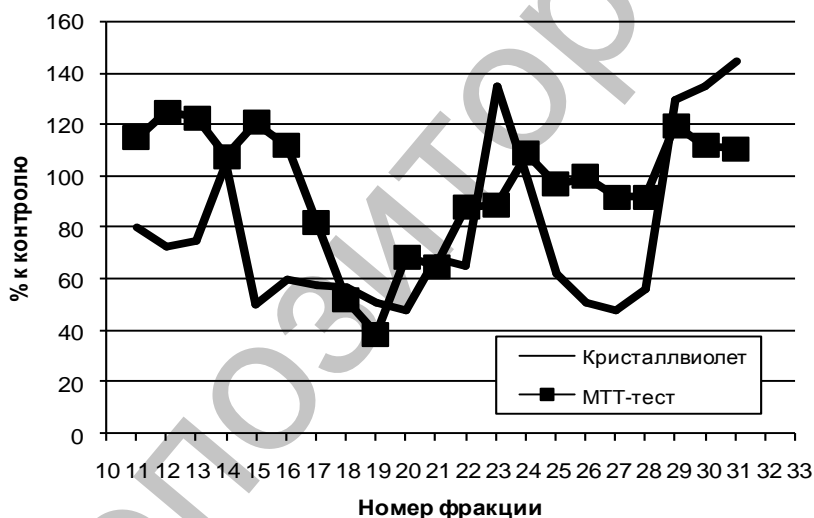


Рис. 4. Рост клеток 29 ЗТ (иммортиализованные аденовирусом 5 типа эмбриональные клетки почек человека) через 48 ч после инкубации с пептид-содержащими фракциями гемолимфы.

В этой же области пептидсодержащих фракций гемолимфы найдено их аналогичное влияние на рост клеток 29 ЗТ – иммортализованные аденовирусом 5 типа эмбриональные клетки почек человека. Ингибирующее действие на рост этих клеток по результатам МТТ-теста оказали также фракции 18–22. При окраске кристаллвиолетом зона ингибирования была более широкой, а именно такой эффект демонстрировали фракции 15–22. Кроме того, при

окрашивании кристаллвиолетом найдено ингибирующее действие на рост клеток фракций 25–28 (рис. 4).

Сравнительный анализ влияния фракций гемолимфы на рост клеток Нер G2 и 29 ЗТ показал, что после ингибирующего действия фракций 18–22 наступает в той или иной степени выраженности активирующее действие компонентов последующих фракций зоны пептидов гемолимфы.

Аналогичная активность фракций гемолимфы была получена также при исследовании роста клеток карциномы молочной железы (рис. 5). В этом эксперименте удалось показать, что выявленные эффекты ингибирования и активации роста клеток, вызываемые рядом расположенными фракциями гемолимфы, прослеживаются через 48 и 72 часа культивирования клеток.

В экспериментах по исследованию влияния фракций гемолимфы на рост клеток невриномы

гассерова узла крысы и клеток карциномы шейки матки были получены отличающиеся от предшествующих результаты (рис. 6). Некоторое ингибирование роста было обнаружено при действии компонентов фракций 11 (НГУК1) и фракций 10, 13 (HeLa). Последующие фракции усиливали рост клеток невриномы (особенно фракции 17–25), а клетки карциномы шейки матки более интенсивно росли в присутствии фракций 16–18 и в диапазоне фракций 26–30.

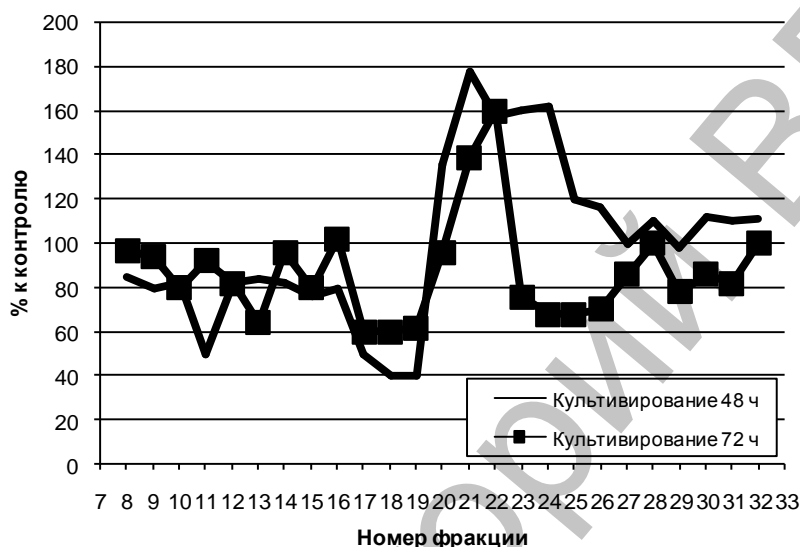


Рис. 5. Рост клеток MCF7 (клетки карциномы молочной железы человека) при культивировании 48 и 72 часа.

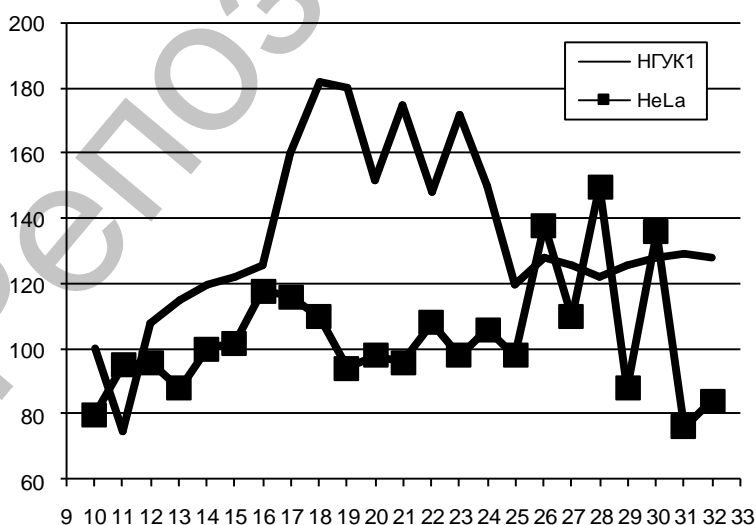


Рис. 6. Рост клеток НГУК1 (клетки невриномы гассерова узла крысы) и HeLa (клетки карциномы шейки матки) через 72 ч после инкубации с фракциями гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащими пептиды.

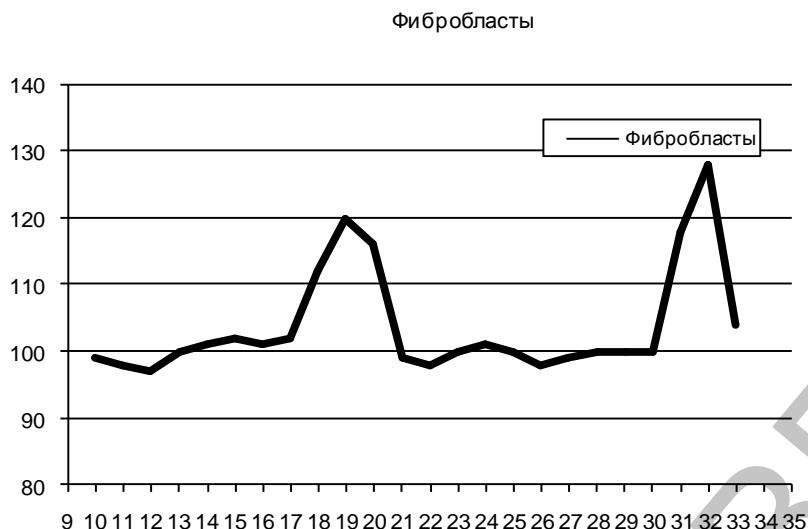


Рис. 7. Рост клеток нормальных фибробластов человека через 72 ч после инкубации с фракциями гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащими пептиды.

Таким образом, в присутствии фракций гемолимфы, содержащих пептиды, обнаружены активирующее и ингибирующее влияния на рост трансформированных клеток.

Наличие такого эффекта было исследовано в эксперименте по влиянию фракций гемолимфы, содержащих пептиды, на рост фибробластов нормальной кожи человека (рис. 7). Оказалось, что фракции гемолимфы не тормозили рост клеток фибробластов. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток рост фибробластов усиливался компонентами фракций 19 и 20. Кроме того, активировали рост фибробластов также фракции 31 и 32.

Для выявления природы полученных эффектов компонентов гемолимфы на рост культивируемых клеток необходимы дальнейшие исследования, например, путем изучения особенностей биосинтеза белков и ДНК в них.

Заключение. При исследовании влияния пептидсодержащих фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда установлено, что фракции 18–22 подавляли рост клеток гепатомы Нер G2, иммортализованных аденовирусом 5 типа эмбриональных клеток почек человека 29 3Т и клеток карциномы молочной железы MCF7. Рост клеток невриномы гассерова узла крысы НГУК1 и клеток карциномы шейки матки HeLa частично ингибировался компонентами фракций 10–13. Выявлены эффекты стимуляции роста клеток *in vitro* фракциями гемолимфы, расположенными рядом с фракциями, ингиби-

рующими рост трансформированных клеток. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток рост фибробластов не подавлялся, а даже усиливался компонентами фракций 19 и 20. Кроме того, активировали рост фибробластов также компоненты фракций 31 и 32. Полученные результаты имеют принципиальное значение для использования куколок дубового шелкопряда для создания новых биофармацевтических цитостатических и стимулирующих рост клеток препаратов.

Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б11ВТ-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисова, С.И. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда / С.И. Денисова [и др.] // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2007. – № 1(43). – С. 143–149.
2. Чиркин, А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 1(61). – С. 30–36.
3. Чиркин, А.А. Функциональные и биохимические характеристики гемолимфы куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы VIII Междунар. конф., 1–2 апреля 2010 г. – Минск, 2010. – С. 130–132.
4. Чиркин, А.А. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций / А.А. Чиркин [и др.] // Молекулярная и биохимическая фармакология: материалы междунар. науч. конф., посвященной 80-летию НАН Б, Гродно, 25–26 сентября 2008 г. – Гродно, 2008. – С. 80–82.
5. Чиркин, А.А. Оценка цитотоксичности водного экстракта куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Молекулярная и биохимическая фармакология: материалы междунар. науч. конф., посвященной 80-летию НАН Б, Гродно, 25–26 сентября 2008 г. – Гродно, 2008. – С. 83–84.

Поступила в редакцию 14.09.2011. Принята в печать 28.10.2011

Адрес для корреспонденции: 210038, г. Витебск, Московский пр-т, д. 33, e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.