

## ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРА ОКСИДА АЗОТА ( $\text{NaNO}_2$ ) НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА К ГИПЕРТЕРМИИ

© О. И. Большакова, А. Г. Свердлов, С. И. Тимошенко, Н. Г. Никанорова, С. А. Грачев

*С.-Петербургский институт ядерной физики РАН, Гатчина*

В предыдущих работах нами было показано снижение чувствительности клеток китайского хомячка линии V79 к гамма- и УФ-излучениям под влиянием индуктора оксида азота ( $\text{NaNO}_2$ ). Представляло интерес исследование действия донора NO на клетки при гипертермии. Показано, что 1-часовая инкубация с донором NO увеличивает выживаемость клеток, нагретых до 45 °С, и снижает частоту возникающих в них хромосомных aberrаций. Ингибитор синтеза белка циклогексимида (ЦГИ), а также совместное действие ЦГИ и  $\text{NaNO}_2$  одинаково увеличивают выживаемость клеток при гипертермии. Высказано предположение о связи указанных эффектов экзогенного NO с белком теплового шока Hsp70. Показанное снижение количества хромосомных aberrаций под влиянием донора NO в клетках, подвергнутых нагреванию, может играть определенную роль в модифицирующем влиянии донора NO на выживаемость клеток при гипертермии.

Ключевые слова: клетки V79, оксид азота, гипертермия, хромосомные aberrации, выживаемость, циклогексимид.

Исследование влияния оксида азота (NO) на различные стороны жизнедеятельности клеток выявили его способность повреждать ДНК клеток, нарушать функцию митохондрий и вызывать ряд других изменений клеточных элементов (Брюне и др., 1998; Малышев, Манухина, 1998; Murphy, 1999). Вместе с тем в последние годы получен ряд данных о том, что этот же радикал, эндогенный или привнесенный извне, может благоприятно влиять на про- и эукариотические клетки, повышая их устойчивость к вредным воздействиям. Это показано в отношении действия NO на кишечную палочку, нейроны мозжечка и даже на выживаемость крыс после облучения (Пинелис и др., 1997; Lobysheva, Stupakova, 1999; Красильников, 2000). Этот перечень невелик, но он несколько расширился в результате наших наблюдений, показавших, что под влиянием  $\text{NaNO}_2$ , вызывающего при попадании в клетки повышение содержания в них NO (Реутов, 1995), увеличивается устойчивость клеток китайского хомячка к гамма- и УФ-излучениям (Грачев и др., 2002; Большакова и др., 2004).

Таким образом, накапливаются данные о способности NO или его доноров снижать чувствительность клеток к повреждающим, в том числе экологически небезразличным, факторам. В связи с изложенным интересно исследовать влияние NO на чувствительность клеток к другим повреждающим агентам, причем не только химической или электромагнитной природы, но и к таким, как повышение температуры.

Задача настоящего исследования заключалась в изучении влияния донора NO на чувствительность клеток к нагреванию и выяснении связи эффекта донора NO с изменением синтеза белка в клетках, подвергнутых нагреванию. Кроме того, предполагалось выяснить влияние

NO на частоту хромосомных aberrаций, возникающих при нагревании клеток.

### Материал и методика

Работа выполнена на культуре клеток китайского хомячка линии V79. Клетки культивировали в среде Игла с добавлением глутамина, 10 % бычьей сыворотки и антибиотиков (200 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл канамицина). Для исследования хромосомных aberrаций клетки выращивали на покровных стеклах в течение 24 ч и нагревали при 42, 43 или 45 °С в течение 15, 30, 45 и 60 мин. До или после воздействия повышенной температуры клетки выдерживали в течение 60 мин в среде, содержащей 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$ , затем среду меняли на свежую. Еще через 1 сут стекла вынимали из флаконов, клетки фиксировали этиловым спиртом, окрашивали орсеином и готовили постоянные препараты, которые анализировали в световом микроскопе. Для каждого случая анализировали не менее 3 стекол, считая по 100 анафаз на 1 стекле. Эксперименты повторяли несколько раз. Всего посчитано 4000 анафаз.

Выживаемость клеток исследовали по общепринятой методике (Puck et al., 1956). После нагревания клетки снимали раствором Версена, считали в камере Фукс-Розенталя, многократно разводили и рассевали по 100 клеток на флакон Карреля; pH культуральной среды подкисляли с помощью HCl. Через 8 сут колонии окрашивали метиленовым синим и подсчитывали их количество.

Гипертермическую обработку клеток в экспериментах по исследованию выживаемости проводили при

45 °С в течение 30 мин. При этом использовали две схемы экспериментов: 1)  $\text{NaNO}_2$  добавляли к клеткам на 60 мин, затем среду сливали, заменяли на свежую и на 30 мин клетки помещали в термостат при 45 °С; 2) клетки нагревали 30 мин при 45 °С, затем к ним добавляли  $\text{NaNO}_2$  на 60 мин.

Вторую серию экспериментов проводили с использованием ингибитора синтеза белка циклогексимида (ЦГИ) в концентрации 7.5 мкг/мл. Доза ЦГИ взята из работы Сеткова с сотрудниками (1991). Схемы экспериментов были следующими: 1) ЦГИ добавляли к клеткам на 60 мин и выдерживали при 37 °С; 2) ЦГИ добавляли к клеткам и выдерживали их 30 мин при 45 °С, затем еще 30 мин при 37 °С; 3)  $\text{NaNO}_2$  добавляли к клеткам на 60 мин, затем среду заменяли на свежую, содержащую ЦГИ, и на 30 мин помещали в термостат при 45 °С, после этого еще 30 мин клетки с ЦГИ выдерживали при 37 °С.

Достоверность сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

**Реактивы.** В работе использовали среду Игла MEM, раствор Версена и бычью сыворотку («Биолот», Россия), бензилпенициллин и канамицин («Биохим», Россия), циклогексимид (Sigma, США), орсеин и метиленовый синий («Рехим», Россия), HCl и этанол (Россия).  $\text{NaNO}_2$  был синтезирован в Лаборатории органического синтеза С.-Петербургского института ядерной физики РАН (Гатчина).

## Результаты и обсуждение

Как показывают данные, приведенные на рис. 1, 30-минутное нагревание клеток до 45 °С почти на 20 % снижает их выживаемость, которая составляет 83.7 % в контроле и 65.6 % при 45 °С. Инкубация клеток с  $\text{NaNO}_2$  перед нагреванием практически устраняет эффект гипертермии; выживаемость клеток, подвергнутых нагреву, составляет 80.88 %. Таким образом, повышение содержания NO в клетках элиминирует эффект нагревания, т. е. снижает чувствительность клеток к повреждающему действию высокой температуры. В то же время добавление  $\text{NaNO}_2$  к культуре клеток после нагревания не приводит к повышению их выживаемости. Это наблюдение, по-видимому, указывает на то, что для модификации эффекта гипертермии с помощью NO необходимо его присутствие в клетке на относительно ранней фазе термического повреждения.

Каков механизм продемонстрированного защитного действия  $\text{NaNO}_2$  на нагреваемые клетки? Чтобы приблизиться к ответу на этот вопрос, мы провели эксперименты с ЦГИ, и их результаты дают основание для некоторых предположений. На рис. 1 показано, что ЦГИ оказывает на нагреваемые клетки такое же защитное действие, как и  $\text{NaNO}_2$ , повышая их выживаемость до 77 %, от 65.6 % при 45 °С. Совместное применение этих агентов показало, что они не взаимодействуют друг с другом и не влияют на защитный эффект друг друга; выживаемость нагретых клеток в этом случае составляет 80 %. Это позволяет допустить, что оба вещества действуют с помощью одного и того же механизма или близких механизмов. Определенную интерпретацию этих фактов можно предложить, если сопоставить их с результатами других исследователей. Как заключают Малышев и сотрудники (Malyshev et al., 1995), обнаружившие накопле-

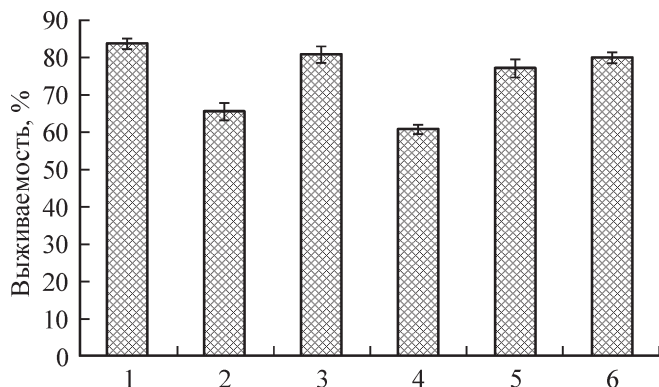


Рис. 1. Влияние  $\text{NaNO}_2$  и циклогексимида (ЦГИ) на выживаемость клеток V79, подвергнутых нагреванию при 45 °С.

1 — контроль (интактные клетки); 2 — 45 °С, 30 мин; 3 — действие 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$  в течение 60 мин, затем нагревание при 45 °С в течение 30 мин; 4 — 45 °С, 30 мин, затем добавление 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$  на 60 мин; 5 — совместное действие 7.5 мкг/мл ЦГИ и нагревания при 45 °С; 6 — действие 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$  в течение 60 мин, затем совместное действие 7.5 мкг/мл ЦГИ и нагревания при 45 °С. Различия средних величин сравниваемых групп статистически достоверны ( $P \leq 0.01$ ), кроме групп 4 и 6.

ние белков стресса в тканях при различных повреждениях, в том числе и гипертермии, роль стресс-белков неодинакова: их адаптогенная функция обеспечивается главным образом одним из них — Hsp70. По данным этих авторов, в накоплении стресс-белков при исследованных повреждающих воздействиях участвует NO. В то же время показано, что ЦГИ по-разному влияет на синтез стресс-белков, подавляя образование одних и стимулируя накопление других (Lee et al., 1987). Сопоставляя результаты наших опытов с приведенными данными, можно предложить, что как при действии  $\text{NaNO}_2$ , так и под влиянием ЦГИ ослабление эффекта гипертермии связано с накоплением одного и того же фактора — Hsp70. Такое предположение объясняет и защитный эффект обоих агентов, и независимость их воздействий, и одинаковое понижение чувствительности клеток к нагреванию. Разумеется, это лишь предположение, требующее дополнительных исследований. Однако каков бы ни был механизм этого феномена, представляется существенным сам факт способности донора оксида азота снижать чувствительность клеток *in vitro* к гипертермии, т. е. еще к одному повреждающему агенту.

Хорошо известно, что гипертермическое повреждение клеток приводит к многочисленным функциональ-

### Выход хромосомных aberrаций в клетках V79 при различных температурных и временных режимах (% $\bar{x} \pm s_x$ )

Температура, °С	Время, мин			
	15	30	45	60
42	—	20.43 ± 0.40	22.57 ± 0.52	24.43 ± 0.32
43	—	22.83 ± 1.51	—	26.67 ± 1.2
45	21.67 ± 0.33	23.67 ± 1.25	—	30.07 ± 0.33
37	Контроль (интактные клетки) 12.47 ± 0.49.			

Примечание. Различия средних величин по отношению к контролю достоверны ( $P \leq 0.01$ ).

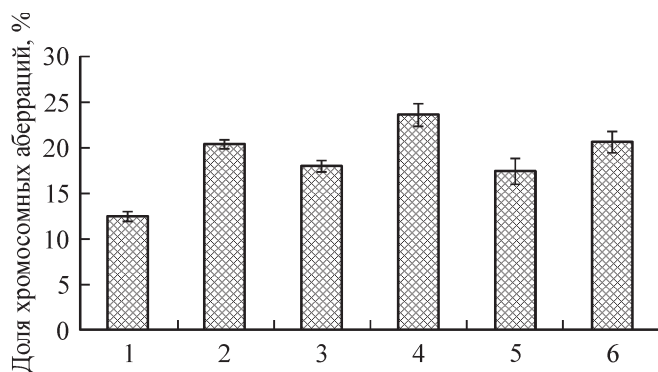


Рис. 2. Влияние  $\text{NaNO}_2$  на частоту хромосомных aberrаций в клетках V79, подвергнутых нагреванию.

1 — контроль (интактные клетки); 2 —  $42^\circ\text{C}$ , 30 мин; 3 — действие  $100\ \mu\text{M NaNO}_2$  в течение 60 мин перед нагреванием при  $42^\circ\text{C}$  в течение 30 мин; 4 — нагревание при  $45^\circ\text{C}$ ; 5 — действие  $100\ \mu\text{M NaNO}_2$  в течение 60 мин перед нагреванием при  $45^\circ\text{C}$ ; 6 — действие  $100\ \mu\text{M NaNO}_2$  в течение 60 мин после нагревания при  $45^\circ\text{C}$ . Различия средних величин сравниваемых групп статистически достоверны ( $P \leq 0.01$ ), кроме групп 4 и 6.

ным и структурным нарушениям, которые могут быть летальными. Поэтому не исключено, что благоприятное влияние донора NO на выживаемость клеток при нагревании в какой-то степени может быть связано с защитой от структурных повреждений. Поэтому мы исследовали влияние  $\text{NaNO}_2$  на aberrации хромосом, которые являются известной причиной гибели клеток в условиях гипертермии. Было исследовано влияние различных температурных и временных режимов на количество хромосомных aberrаций в клетках V79 (см. таблицу). Показано, что при выдерживании клеток при  $42^\circ\text{C}$  в течение 30 мин число хромосомных aberrаций увеличилось в 1.8 раза по сравнению с интактными клетками. При увеличении времени экспозиции до 45 или 60 мин число хромосомных aberrаций возрастает. Инкубация клеток при  $45^\circ\text{C}$  уже через 15 мин увеличивает почти в 2 раза выход хромосомных aberrаций, а 60-минутная экспозиция усиливает этот эффект в 2.5 раза. Эти данные определили условия экспериментов, в которых исследовано влияние донора NO на частоту хромосомных aberrаций в нагреваемых клетках (рис. 2).

На рис. 2 показано, что 30-минутная инкубация клеток при  $42$  и  $45^\circ\text{C}$  вызывает увеличение количества хромосомных aberrаций с 12.47 до 20.43 или 23.67 % соответственно. В то же время преинкубация клеток с  $\text{NaNO}_2$  существенно уменьшает повреждения хромосомного аппарата при последующем нагреве до  $42$  или  $45^\circ\text{C}$ : число aberrаций составляет 17.86 и 17.42 % соответственно. Приведенные цифры показывают, что эффект  $\text{NaNO}_2$  зависит от степени гипертермии, т. е. при более высокой температуре он выражен больше. Подобная закономерность отмечена нами ранее при изучении воздействия УФ-излучения на клетки (Большакова и др., 2004).

Таким образом, защитное действие донора оксида азота на клетки в условиях гипертермии может быть частично связано и с понижением уровня хромосомных aberrаций.

Авторы выражают благодарность В. В. Исаеву-Иванову и В. Г. Королеву за материальную поддержку работы.

### Список литературы

- Большакова О. И., Свердлов А. Г., Тимошенко С. И., Никанорова Н. Г., Бондарев Г. Н., Грачев С. А. 2004. Влияние донора оксида азота ( $\text{NaNO}_2$ ) на устойчивость нетрансформированных и злокачественно перерожденных клеток к ультрафиолетовому и гамма-излучениям. Цитология. 46 (1) : 39—42.
- Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. 1998. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути. Биохимия. 63 (7) : 966—975.
- Грачев С. А., Свердлов А. Г., Большакова О. И., Тимошенко С. И., Никанорова Н. Г. 2002. Повышение радиостойчивости эукариотических клеток с помощью донора NO — натриевой соли азотистой кислоты. Докл. РАН. 383 (4) : 559—561.
- Красильников И. И. 2000. Потенциальные доноры NO как средства ранней терапии лучевых поражений. В кн.: Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины. Науч. тр. НИИ военной медицины. СПб. 2 : 122—128.
- Мальшев И. Ю., Манухина Е. Б. 1998. Стресс, адаптация и оксид азота. Биохимия. 63 (7) : 992—1006.
- Пинелис В. Г., Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Винская Н. П., Исаева Н. К., Викторова И. В. 1997. Влияние токсического воздействия глутамата и нитрата на содержание циклического ГМФ в нейронах и их выживаемость. Докл. РАН. 52 (2) : 259—261.
- Реутов В. П. 1995. Цикл оксида азота в организме млекопитающих. Успехи биол. химии. 35 : 189—228.
- Сетков Н. А., Казаков В. Н., Андреева Т. В. 1989. Влияние циклогексимида на вступление в S-период ядер в гетеродикарионах. Цитология. 33 (12) : 73—78.
- Lee Y. J., Dewey W. C., Li G. C. 1987. Protection of Chinese hamster ovary cells from heat killing by treatment with cycloheximide or puromycin: involvement of HSPs. Radiat. Res. 111 : 237—253.
- Lobysheva I. I., Stupakova M. D. 1999. Induction of the SoS DNA repair responds in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and SS-nitrothiols. FEBS Lett. 454 : 177—180.
- Malyshev Yu., Manukhina E. B., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., Vanin A. F. 1995. Nitric oxide is involved in heat-induced Hsp70 accumulation. FEBS Lett. 370 : 159—162.
- Murphy M. P. 1999. Nitric oxide and cell death. Biochem. Biophys. Acta. 1411 : 401—414.
- Puck T., Markus Ph. A., Ciecura S. 1956. Clonal growth of mammalian cells *in vitro*. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a «feeder» lauer. J. Exp. Med. 103 : 273—283.

THE INFLUENCE OF NITRIC OXIDE INDUCTOR (NaNO<sub>2</sub>) ON THE SENSITIVITY OF CHINESE HAMSTER CELLS TO HYPERTHERMIA*O. I. Bolshakova, A. G. Sverdlov, S. I. Timoshenko, N. G. Nikanorova, S. A. Grachev*

St. Petersburg Nuclear Physics Institute RAS, Gatchina, Leningrad District

Formerly we reported the reduction of sensitivity to gamma- and UV-radiation in Chinese hamster cells of line 90 under the influence of nitric oxide inductor (NaNO<sub>2</sub>). Of interest was to learn if it possible to reduce the influence of hyperthermia on cells by means of NO inductor. A 1 h long incubation with this NO donor demonstrated an increased survival of cells heated up to 45 °C, and a decreased frequency of chromosomal aberrations in these. Employment of cycloheximide (CHE), an inhibitor of protein synthesis, and administration of CHE together with nitric oxide donor (NaNO<sub>2</sub>), equally increased the cell survival at hyperthermia. These and relevant literature data suggest that the demonstrated effect of exogenous NO may be associated with HSP70 protein. The noticed decrease in the number of chromosomal aberrations in heated cells under the influence of NO donor may play an important role in its modifying effect on cells at hyperthermia.

---