

## ВЛИЯНИЕ НАТРИЕВОЙ СОЛИ АЗОТИСТОЙ КИСЛОТЫ НА ОСМОУСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

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

*С.-Петербургский институт ядерной физики РАН, Гатчина, Ленинградская обл.;*  
*электронный адрес: olya9991@yandex.ru*

Ранее нами было показано снижение чувствительности клеток китайского хомячка линии V-79 к гамма-лучам, УФ-радиации и гипертермии под влиянием  $\text{NaNO}_2$ . Представляло интерес исследование влияния этого вещества на осмоустойчивость клеток. Показано, что предварительная обработка этим веществом приводит к существенному повышению количества выросших через 48 ч клеток и уменьшению выраженности морфологических изменений, вызываемых в клетках разной тоничностью среды. Указанный эффект наблюдается как при гипер-, так и при гипоосмии. В опытах с повышением концентрации  $\text{NaCl}$  в среде установлено, что увеличение числа растущих клеток под влиянием  $\text{NaNO}_2$  сопровождается заметным повышением митотического индекса. Таким образом,  $\text{NaNO}_2$  повышает устойчивость клеток к повреждающему действию не только радиационных факторов и гипертермии, но и к изменениям тоничности среды. Авторы предполагают, что в повышении устойчивости клеток к изменениям осмотического давления важная роль принадлежит оксиду азота, привнесенному в клетку метаболизирующим  $\text{NaNO}_2$ , который выступает в качестве донора  $\text{NO}$ .

Ключевые слова: клетки V-79, донор оксида азота, митотический индекс, тоничность, осмоустойчивость.

Принятые сокращения:  $\text{NO}$  — оксид азота.

Несмотря на огромное количество работ, посвященных влиянию  $\text{NO}$  на клетку, интерес к этому вторичному мессенджеру не ослабевает, поскольку наряду с материалами о повреждающем действии  $\text{NO}$  на ДНК клеточного ядра, митохондрий и на функциональное состояние клеток (Мальшев, Манухина, 1998; Сорокина и др., 1999; Murphy, 1999) получены данные о защитном действии оксида азота на про- и эукариотические клетки против некоторых повреждающих воздействий (Пинелис и др., 1997; Lobysheva, Stupakova, 1999). Более того, радиозащитный эффект молсидомина на гамма-облученных крыс также связывают с влиянием  $\text{NO}$  (Красильников, 2000). Согласно литературным данным,  $\text{NO}$  в разных концентрациях действует по-разному на различные клетки, находящиеся в разных состояниях (Брюне и др., 1998; Ванин, 2004). По-прежнему остаются неизученными многие аспекты его действия. В последнее время нами показано, что преинкубация клеток китайского хомячка в культуральной среде, содержащей 100 мкМ натриевой соли азотистой кислоты, увеличивает устойчивость клеток китайского хомячка к таким разным по своей природе факторам, как гамма-лучи, УФ-радиация и гипертермия (Грачев и др., 2002; Большакова и др., 2004, 2005). Известно, что в процессе внутриклеточного метаболизма этой соли образуется  $\text{NO}$ . Обладая свойствами радикала, это вещество активно взаимодействует с внутриклеточными тиолами, соединениями железа, белками и ненасыщенными жирными кислотами, существенно изменяя функциональное состояние клетки и

участвуя в регуляции внутриклеточных процессов (Реутов, 1995; Ванин, 2004). Многие исследователи рассматривают указанную соль азотистой кислоты, в первую очередь как донор  $\text{NO}$  для клетки (Johnson et al., 1991; Akarid et al., 1995; Пинелис и др., 1997; Самосудова и др., 2000). Обоснованность такой точки зрения обусловлена тем, что нитриты легко восстанавливаются в клетке в  $\text{NO}$  при участии ферментативных и неферментативных систем (Реутов, Сорокина, 1998; Серая, Нарциссов, 2002). Можно предположить, что  $\text{NO}$  играет роль одного из существенных факторов, определяющих природную или меняющуюся в соответствии с условиями резистентность клетки. Справедливо ли такое предположение? Для решения этого вопроса представляется важным исследование влияния  $\text{NaNO}_2$  на устойчивость клеток к изменениям условий, определяющих само их существование, в частности состава окружающей среды.

Задачей данного исследования и является изучение влияния этой соли, биологическую активность которой связывают в первую очередь с образованием  $\text{NO}$ , на чувствительность клеток в условиях изменения тоничности среды.

### Материал и методика

Работа выполнена на культуре клеток китайского хомячка линии V-79. Клетки культивировали в среде Игла с добавлением глутамина, 10 % бычьей сыворотки и ан-

тибиотиков (200 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл канамицина). В каждый флакон Карреля было посеяно  $7 \cdot 10^4$  клеток.

В качестве источника NO была использована натриевая соль азотистой кислоты ( $\text{NaNO}_2$ ). Действие донора NO в условиях добавления в среду  $\text{H}_2\text{O}$  и различных концентраций NaCl оценивали, подсчитывая в камере Фукс-Розенталя общее количество клеток, выросших во флаконе, по митотическому индексу и изменениям морфологии клеток.

Гипотонию создавали путем разведения культуральной среды (0.15 М) стерильной водой в 2.0, 1.7, 1.4, 1.25 и 1.1 раза, после чего молярность среды составляла 0.075, 0.088, 0.107, 0.12 и 0.136 М соответственно. Гиперосмию создавали добавлением в среду NaCl, увеличивая молярность среды до 0.17, 0.35, 0.65, 1.15 и 2.15 М.

Через 1 сут после начала роста клеток к ним добавляли 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$  и выдерживали при 37 °С в течение 60 мин. Затем среду меняли на свежую, содержащую различные концентрации NaCl или разбавленную  $\text{H}_2\text{O}$ , и инкубировали 48 ч при 37 °С. Всего было проведено 22 серии по 3—4 опыта в каждой.

Для подсчета митотического индекса клетки выращивали на покровных стеклах. Через 1 сут после начала инкубации клетки выдерживали при 37 °С в течение 60 мин в среде, содержащей 100 мкМ  $\text{NaNO}_2$ , затем меняли ее на свежую, содержащую 0.17 или 0.35 М NaCl. Через 24 или 48 ч стекла с клетками фиксировали этиловым спиртом, готовили постоянные препараты и окрашивали орсеином. На каждую точку просчитывали не менее 3 стекол (1000 клеток на 1 стекло). Всего подсчитано  $126 \cdot 10^3$  клеток.

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); орсеин, NaCl и этанол («Реахим», Россия),  $\text{NaNO}_2$  синтезировали в Лаборатории органического синтеза С.-Петербургского института ядерной физики РАН (Гатчина).

## Результаты и обсуждение

По данным Морозова с соавторами (1996), выживаемость клеток зависит от концентрации NaCl в среде. Согласно Оводкову с соавторами (1987), NaCl в концентрации 1.5 М может оказывать летальное воздействие на клетки V-79 даже при 15-минутной инкубации в этой среде. Нами были проведены исследования влияния 0.17, 0.35, 0.65, 1.15 и 2.15 М NaCl на общее количество клеток, выросших во флаконе Карреля. Показано, что в

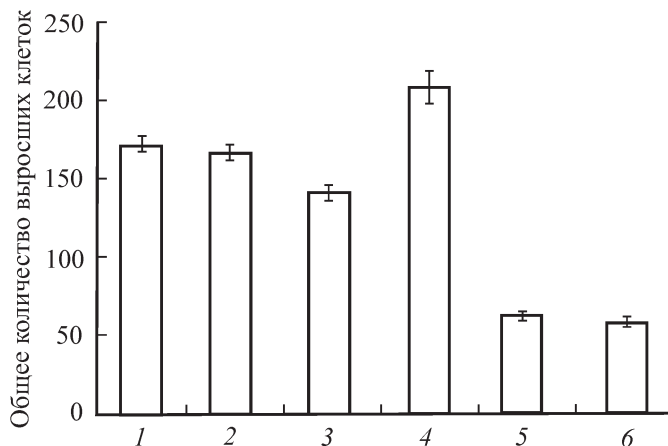


Рис. 1. Влияние  $\text{NaNO}_2$  на общее количество клеток V-79, выросших во флаконе со средой, содержащей различные конечные концентрации NaCl.

1 — интактные клетки; 2 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин при инкубации интактных клеток; 3 —  $[\text{NaCl}]$ , 0.17 М в течение 48 ч; 4 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в течение 48 ч в среде, содержащей  $[\text{NaCl}]$ , 0.17 М; 5 —  $[\text{NaCl}]$ , 0.35 М в течение 48 ч; 6 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в течение 48 ч в среде, содержащей  $[\text{NaCl}]$  0.35 М. Общее количество клеток, выросших во флаконе, —  $1 \cdot 10^4$ . Различия средних величин по отношению к интактным клеткам статистически достоверны ( $P \leq 0.01$ ), кроме групп 4 и 5.

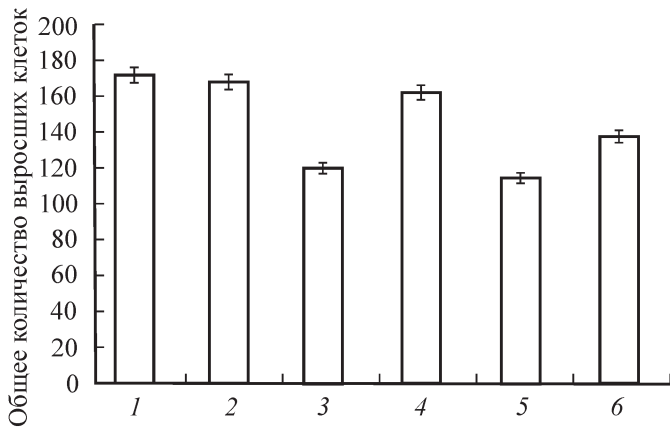
среде, содержащей 1.15 и 2.15 М соли, все клетки погибли через 24 ч, а при использовании 0.65 М NaCl гибель клеток отмечалась через 48 ч. В дальнейшем мы использовали в своей работе концентрации соли 0.17 и 0.35 М, при которых часть клеток выживала и продолжала расти. На рис. 1 приведены данные о количестве клеток, выросших во флаконе Карреля после предварительной инкубации с  $\text{NaNO}_2$  и культивирования в течение 48 ч в среде, содержащей 0.17 и 0.35 М NaCl. Установлено, что использование 0.17 М NaCl снижает количество выросших клеток. Однако в группе клеток с предварительной обработкой  $\text{NaNO}_2$  их число значительно увеличивается по сравнению с контролем, что указывает на положительное влияние продуктов метаболизма использованной соли, среди которых не последнее место, по-видимому, принадлежит радикалу NO. Повышение концентрации соли в ростовой среде до 0.35 М в 3 раза снижает количество выросших клеток по сравнению с интактными. Предварительная инкубация клеток с  $\text{NaNO}_2$  в этих условиях не оказывает цитопротекторного эффекта.

Увеличение количества выросших клеток после предварительной обработки натриевой солью азотистой кислоты может быть связано с усилением интенсивности деления клеток под влиянием  $\text{NaNO}_2$ . Для выяснения этого предположения исследовали влияние  $\text{NaNO}_2$  на величину митотического индекса клеток в гипертониче-

### Митотический индекс (% $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) клеток V-79, преинкубированных с $\text{NaNO}_2$ и выросших во флаконе со средой, содержащей различные конечные концентрации NaCl

Время, ч	Интактные клетки	$\text{NaNO}_2$	0.17 М NaCl	$\text{NaNO}_2 + 0.17 \text{ М NaCl}$	0.35 М NaCl	$\text{NaNO}_2 + 0.35 \text{ М NaCl}$
24	$33.17 \pm 2.49$	—	$30.0 \pm 1.97^a$	$48.09 \pm 1.79^a$	—	—
48	$30.22 \pm 1.16$	$28.86 \pm 2.67$	$28.14 \pm 1.56^a$	$36.80 \pm 1.22^a$	$14.71 \pm 0.89^a$	$18.20 \pm 1.29^a$

<sup>a</sup> Различия средних величин сравниваемых групп статистически достоверны ( $P \leq 0.01$ ).



ских условиях. Результаты определения митотического индекса клеток V-79, преинкубированных с  $\text{NaNO}_2$  и выращенных в среде с различным содержанием соли, приведены в таблице. Из данных таблицы следует, что и сам  $\text{NaNO}_2$ , и  $\text{NaCl}$  в концентрации 0.17 M не изменяют вели-

Рис. 2. Влияние  $\text{NaNO}_2$  на общее количество клеток V-79, выросших во флаконе с различным разведением среды  $\text{H}_2\text{O}$ .

1 — интактные клетки; 2 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин при инкубации интактных клеток; 3 — разведение среды  $\text{H}_2\text{O}$  в 1.1 раза (0.136 M), инкубация в течение 48 ч; 4 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в течение 48 ч в среде, разведенной  $\text{H}_2\text{O}$  в 1.1 раза (0.136 M); 5 — разведение среды  $\text{H}_2\text{O}$  в 1.4 раза (0.107 M), инкубация в течение 48 ч; 6 —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в течение 48 ч в среде, разведенной  $\text{H}_2\text{O}$  в 1.4 раза (0.107 M). Общее количество клеток, выросших во флаконе, —  $1 \cdot 10^4$ . Различия средних величин по отношению к интактным клеткам статистически достоверны ( $P \leq 0.01$ ).

чину митотического индекса по сравнению с этим показателем у интактных клеток. Вместе с тем преинкубация клеток с  $\text{NaNO}_2$  и дальнейшее их содержание в среде с 0.17 M  $\text{NaCl}$  в течение 24 или 48 ч увеличивают митотический индекс в обоих случаях, причем его величина превышает таковую интактных клеток. Увеличение концентрации соли до 0.35 M вызывает падение митотического индекса на 50 %, а продукты обмена  $\text{NaNO}_2$ , содержащие и NO, и в этих условиях повышают этот показатель.

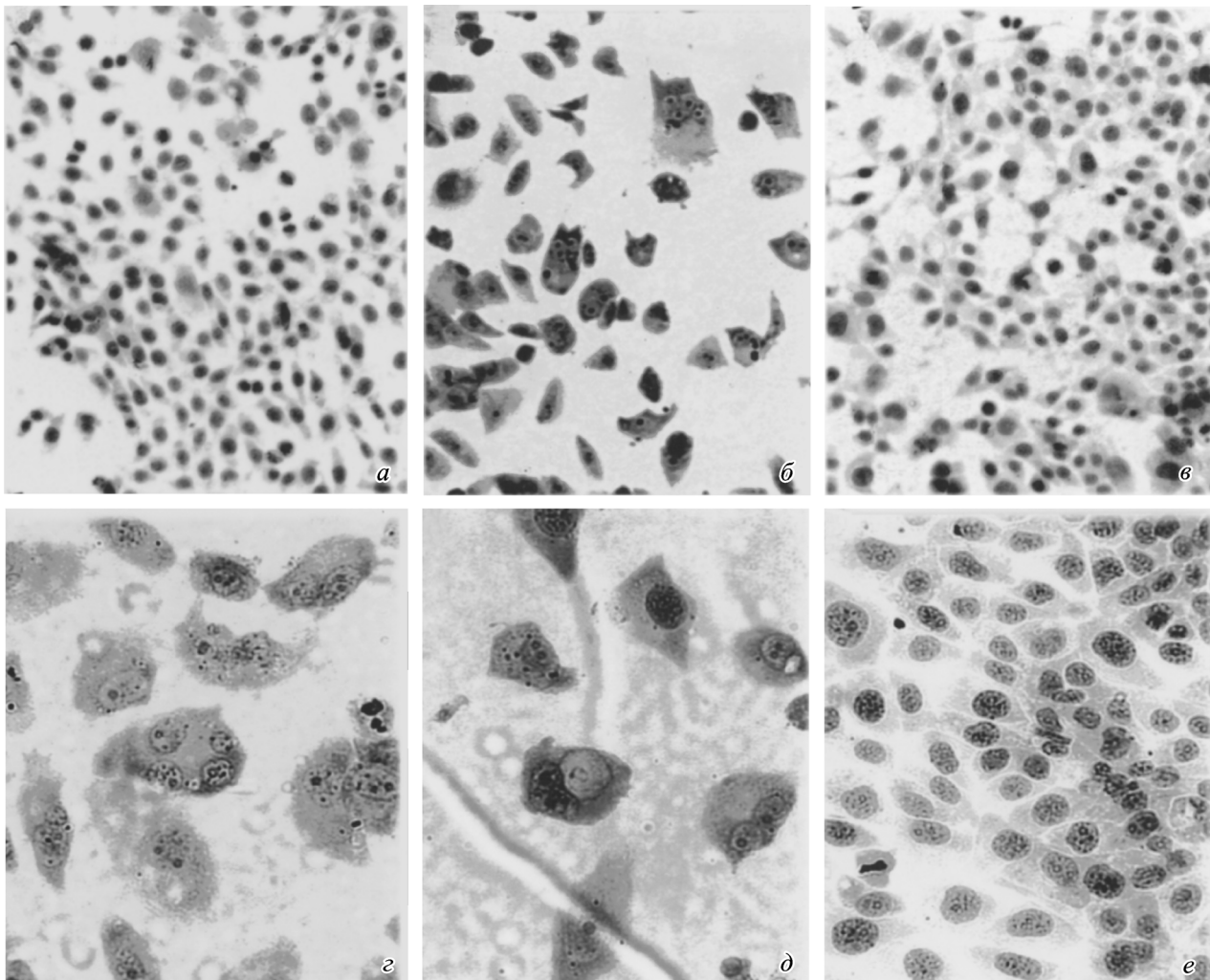


Рис. 3. Влияние  $\text{NaNO}_2$  на морфологическую картину клеток, выросших во флаконе со средой, содержащей  $\text{NaCl}$ .

a — интактные клетки; б —  $[\text{NaCl}]$ , 0.35 M в течение 48 ч; в —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в среде, содержащей  $[\text{NaCl}]$ , 0.35 M в течение 48 ч; г, д —  $[\text{NaCl}]$ , 0.35 M в течение 48 ч; е —  $[\text{NaNO}_2]$ , 100 мкМ в течение 60 мин перед инкубацией в среде, содержащей  $[\text{NaCl}]$ , 0.35 M в течение 48 ч. Увел.: а–б — об. 10×, ок. 10×; г–е — об. 20×, ок. 10×.



Прежде чем провести эксперименты с клетками, выращенными в условиях гипотонии, были поставлены опыты с определением их выживаемости при инкубации в среде с добавлением в нее разного количества воды. Установлено, что при разведении питательной среды водой в 1.7 (0.88 М), 2.0 (0.075 М) и 2.5 (0.06 М) раза через 2 сут отмечается почти полная гибель клеток. При разведении в 1.4 раза (0.107 М) выживает небольшая часть клеток. Поэтому в дальнейшем использовали ростовую среду, разведенную в 1.25 (0.12 М) и 1.1 (0.136 М) раза.

На рис. 2 приведены данные о влиянии  $\text{NaNO}_2$  на количество выросших клеток V-79, культивируемых в гипотонической среде. При разведении культуральной среды водой в 1.1 раза (0.136 М) их количество снижается по сравнению с интактными, а использованием  $\text{NaNO}_2$  повышает количество выросших клеток до уровня интактных. При разведении ростовой среды водой в 1.25 раза (0.12 М) также снижается выживаемость клеток, а преинкубация с  $\text{NaNO}_2$  оказывается менее эффективной, чем при использовании среды с разведением водой в 1.1 раза (0.136 М).

Необходимо отметить, что использование сред как с повышенной, так и с пониженной тоничностью отрицательно сказывается на состоянии клеток. Морфологически это проявляется в увеличении размеров и изменении формы клеток, усилении вакуолизации и набухании цитоплазмы, клетки слабее окрашиваются, в ядрах видны включения (рис. 3, б, з, д). Зачастую в поле зрения обнаруживаются фрагменты клеток, много гигантских, многоядерных клеток (рис. 3, б, з). Согласно Перту (1978), использование больших концентраций  $\text{NaCl}$  приводит к дегидратации внутриклеточной среды, а это в свою очередь может вызывать изменения в конформации макромолекул и, таким образом, повлиять на их функции.

Однако при использовании нами  $\text{NaNO}_2$  морфологическая картина клеток нормализуется (рис. 3, в, е), что, вероятно, свидетельствует об улучшении функционального состояния клеток.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что клетки выживают в среде с молярностью 0.136 и 0.12, а в средах 0.107 и 0.088 М, как отмечалось ранее, выживает небольшая часть клеток. Предварительное добавление в среду  $\text{NaNO}_2$  оказывает благотворное влияние на выживаемость клеток даже при использовании гипотонической 0.107 и 0.088 М среды. Но эти эффекты не были постоянны от опыта к опыту, и в дальнейшем эксперименты с этими разведениями не были продолжены. В отличие от условий гипотонии при использовании гипертонических растворов выявлено, что диапазон солевой концентрации, в пределах которого возможна выживаемость клеток, очень узок. В наших опытах он соответствует 0.17 М. Предобработка клеток  $\text{NaNO}_2$  вызывает в этом случае значительный протекторный эффект, создавая благоприятные условия для клеток, поврежденных гипертонией: через 48 ч общее количество выросших клеток и митотический индекс в них превышают аналогичные показатели для интактных. Клетки, оправившись от гипертонического стресса, стремятся к восстановлению своей популяции.

Полученные результаты свидетельствуют о способности натриевой соли азотистой кислоты повышать устойчивость клеток китайского хомячка к изменениям осмотического давления. Вместе с тем они не дают осно-

ваний для суждения о том, какой из метаболитов  $\text{NaNO}_2$  (или какие метаболиты) ответствен за повышение осмоустойчивости клеток.

Тем не менее нельзя не обратить внимание на тот факт, что  $\text{NaNO}_2$  и его метаболиты обеспечивают повышение резистентности клеток к повреждающим воздействиям совершенно разной природы. Названные эффекты наблюдаются также при использовании других веществ, способных образовывать NO (Lobysheva, Stupakova, 1999; Красильников, 2000). Можно предположить, что в повышении резистентности клеток к повреждениям разной природы важная роль принадлежит NO. Для суждения о правомерности тех или других предположений необходимы специальные исследования. Однако каковы бы ни были результаты, они, как и описанные в работе факты, могут представлять интерес для теории и практики, особенно медицинской.

Работа выполнена на средства госбюджета.

### Список литературы

- Большакова О. И., Свердлов А. Г., Тимошенко С. И., Никанорова Н. Г., Бондарев Г. Р., 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.
- Большакова О. И., Свердлов А. Г., Тимошенко С. И., Никанорова Н. Г., Грачев С. А. 2005. Влияние индуктора оксида азота ( $\text{NaNO}_2$ ) на чувствительность клеток китайского хомячка к гипертермии. Цитология. 47 (12) : 1031—1034.
- 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.
- Ванин А. Ф. 2004. Динитрозильные комплексы железа — эндогенные сигнальные агенты в клетках и тканях животных и человека (гипотеза). Биофизика. 49 (4) : 581—586.
- Грачев С. А., Свердлов А. Г., Большакова О. И., Тимошенко С. И., Никанорова Н. Г. 2002. Повышение радиостойкости эукариотических клеток с помощью донора NO-натриевой соли азотистой кислоты. Докл. РАН. 383 (3) : 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.
- Малышев И. Ю., Манухина Е. Б. 1998. Стресс, адаптация и оксид азота. Биохимия. 63 (7) : 992—1006.
- Морозов И. И., Морозова Г. В., Петин В. Г. 1996. Зависимость осмотических свойств *Escherichia coli* от температуры. Цитология. 38 (12) : 1269—1273.
- Оводков Ю. В., Фоменкова Т. Е., Глазунов А. В. 1987. Восстановление клеток млекопитающих от термических повреждений, фиксируемых обработкой гипертоническим раствором хлористого натрия. Цитология. 29 (7) : 851—853.
- Перт С. Дж. 1978. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. 336 с.
- 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 окиси азота в организме млекопитающих. Успехи биол. хим. 35 : 89—228.
- Реутов В. П., Сорокина Е. Г. 1998. NO — синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота. Биохимия. 63 (7) : 1029—1040.
- Самосудова Н. В., Реутов В. П., Ларионова Н. П. 2000. Оксид азота как модулятор контрастности основных элементов цитоскелета. Цитология. 42 (1) : 72—78.

Серая И. П., Нарциссов Я. Р. 2002. Современные представления о биологической роли оксида азота. Успехи соврем. биол. 122 (3) : 249—258.

Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Пинелис В. Г., Винская Н. П., Вергун О. В., Ходоров Б. И. 1999. Механизм потенцирующего действия альбумина при токсическом воздействии глутамата: возможная роль окиси азота. Биол. мембраны. 16 (3) : 318—323.

Akarid K., Sinet M., Desforges B., Gougerot-Pocidallo M. A. 1995. Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus *in vitro* and *in vivo*. J. Virol. 69 : 7001—7005.

Johnson G., Tsao P. S., Lefer A. M. 1991. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. Crit. Care Med. 19 : 244—254.

Lobysheva I. I., Stupakova M. D. 1999. Induction of the SoS DNA repair respons in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and SS-nitrosothiols. FEBS Lett. 454 : 177—180.

Murphy M. P. 1999. Nitric oxide and cell death. Biochim. biophys. acta. 1411 : 401—414.

Поступила 1 VI 2006

#### THE INFLUENCE OF SODIUM NITRITE ON THE OSMORESISTANCE OF CHINESE HAMSTER CELLS

O. I. Bolshakova, A. G. Sverdlov, S. I. Timoshenko, N. G. Nikanorova, S. A. Grachev

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

We have previously demonstrated that incubation of V-79 cells in the medium containing the nitric oxide donor, NaNO<sub>2</sub>, increases cell resistance to damaging effect of  $\gamma$ -rays, UV radiation and hyperthermia. In the present study, we investigated the effects of the nitric oxide donor on the sensitivity of V-79 cells to changes in osmolarity of the medium by adding different amounts of sodium chloride or water. We found that pretreatment of the cells with NaNO<sub>2</sub> resulted in a significant increase in the number of growing cells in 48 h after the treatment. The osmolarity-dependent morphological changes in cultured cells were also substantially diminished following NaNO<sub>2</sub> treatment. This effect could be observed under both hyper- and hypoosmosis, and was dependent on concentration of sodium chloride in hypertonic medium (being maximal under 0.17 M NaCl) and on the amount of water in hypotonic medium (being maximal under 1.1 times the dilution with water). In the experiments with increased osmolarity, we found that the observed increase in the number of growing cells following NaNO<sub>2</sub> treatment was accompanied with a significant increase of the mitotic index. These findings indicate that nitric oxide increases cell resistance to the damaging effects of osmotic shock in the way which is similar to the protective effect of these molecules against radiation and hyperthermia. Similarities in the effects of NaNO<sub>2</sub> under different conditions leading to cell damage suggest that nitric oxide might serve as the universal factor participating in recovery of damaged cells and mediating increased cellular resistance to the damaging conditions.