

УМЕНЬШЕНИЕ ТУМОРОГЕННОСТИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЕПАТОМЫ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТОВ И МЕЛАТОНИНА

© Н. А. Филатова, К. М. Кирпичникова, Н. Д. Аксенов,
Е. А. Вахромова, И. А. Гамалей¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Изучали влияние антиоксидантов N-ацетилцистеина (NAC, 10 мМ) и альфа-липоевой кислоты (ALA, 1.25 мМ), а также гормона мелатонина (1 мкМ) на способность клеток мышинной гепатомы МГ22а образовывать опухоли у сингенных мышей С3НА. Возникновение и развитие опухолей после инъектирования мышам клеток, предварительно обработанных в течение 24 ч NAC, ALA или мелатонином, замедлялись, а смертность мышей уменьшалась. Из трех испытанных агентов наиболее выраженным действием обладал мелатонин. Так, на 10-е сут у контрольных мышей, которым инъектировали интактные клетки МГ22а, опухоли возникали в 100 % случаев, а у мышей, которым инъектировали клетки, обработанные NAC или ALA, опухоли возникали только у 40 и 53 % животных соответственно. В случае обработки клеток мелатонином опухоли появлялись только через 18—20 сут после инъекции. К концу срока наблюдений (36 сут) в контроле погибало 67 % мышей, а в случае обработки клеток NAC или ALA доля погибших мышей составляла 20 и 53 % соответственно. В случае мелатонина гибели мышей за период наблюдения не было вообще. Обработка клеток антиоксидантами замедляла (NAC) или полностью блокировала (ALA) прохождение клетками фаз клеточного цикла. После удаления антиоксидантов из среды культивирования клеточный цикл восстанавливался. Мелатонин не изменял распределения клеток по фазам цикла. Эти данные свидетельствуют об отсутствии прямой корреляции между уменьшением клетками туморогенности и изменением их пролиферативной активности. Обсуждаются различные механизмы действия антиоксидантов и мелатонина на клетки, приводящие к временному изменению опухолевого фенотипа в сторону нормализации.

Ключевые слова: туморогенные клетки МГ22а, мышинная гепатома, N-ацетилцистеин, альфа-липоевая кислота, мелатонин, клеточный цикл.

Принятые сокращения: ALA — альфа-липоевая кислота, NAC — N-ацетилцистеин.

Хорошо известно, что нарушение окислительно-восстановительного баланса клетки в ту или иную сторону приводит к изменению активности ключевых молекул различных сигнальных путей в клетке и как следствие — к изменению функций клетки (см. обзоры: Gamaley, Klyubin, 1999; Kimura et al., 2005; Mikhelson, Gamaley, 2008). Избыток активных форм кислорода (АФК) в клетке и в организме ликвидируется рядом антиоксидантов, различных по своему химическому строению. Поскольку АФК являются причиной окислительного стресса и как следствие различных патологических процессов (Finkel, Holbrook, 2000), понятен живой интерес к антиоксидантам, способным предотвратить или уменьшить окислительный стресс. Поэтому в клинической и фармакологической практике антиоксиданты распространяются как необходимые средства сохранения здоровья и нормального функционирования организма (см., например: Tylicki et al., 2003; Rahimi et al., 2005). При этом вопрос о специфичности действия АФК, с одной стороны, и антиоксидантов — с другой — остается открытым. Литература по действию антиоксидантов не позволяет сделать какие-либо выводы о связи между конкретными молекулярными перестройками и изменением физиологической активности при действии антиоксиданта.

Нами показано, что трансформированные клетки разных линий мыши и человека (3Т3-SV40, А431 и МГ22а), которые в норме распознаются и лизируются естественными киллерными клетками (ЕКК), меняют в сторону нормализации свой фенотип и теряют чувствительность к литическому действию ЕКК, если они обработаны антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC) (Гамалей и др., 2010б) или альфа-липоевой кислотой (ALA) (Филатова и др., 2009). Такая же обработка мышинных нетрансформированных клеток 3Т3 не влияет на их устойчивость к действию ЕКК (Филатова и др., 2006). Литическая активность ЕКК по отношению к чужеродным или измененным клеткам относится к целому ряду показателей, по которым оценивают иммунный статус организма (Moretta, Moretta, 2004). Поэтому изменение этого показателя при действии антиоксидантов, особенно тех, которые используются в клинической и фармакологической практике, заслуживает дальнейшего изучения.

Клетки мышинной гепатомы МГ22а из числа исследованных нами трансформированных клеток являются единственными, которые обладают способностью образовывать опухоли у сингенных мышей после инъекции их под кожу. Поэтому задача настоящей работы заключалась в том, чтобы выяснить, сохраняют ли клетки МГ22а тумо-

рогенность после обработки антиоксидантами. Для этого эти клетки, обработанные антиоксидантом, инъецировали под кожу мышам сингенной линии (СЗНА) и следили за развитием опухолей. Исследовали действие антиоксидантов NAC и ALA, а также гормона мелатонина. Мелатонин, будучи гормоном-регулятором биоритмов, обладает выраженным антиоксидантным действием и прямо нейтрализует свободные радикалы (Асуña-Castroviejo et al., 2002) или активирует антиоксидантные ферменты клетки, в частности супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу (Reiter et al., 2003; Rodriguez et al., 2004). Кроме того, мелатонин благодаря своим многочисленным свойствам нашел применение в клинике как фармакологический агент (Анисимов и др., 2004).

Материал и методика

Клетки мышинной гепатомы линии МГ22а (из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Линейноспецифическая гепатома 22а — это субштамм гепатомы 22а, индуцированной ортоаминоазотолуолом у мышей СЗНА, и, по данным цитологического изучения, опухоль имеет гепатоцеллюлярное происхождение и относится к анапластическим карциномам (Гельштейн, 1971). Опухоль туморогенна только у сингенных животных. Концентрированные растворы NAC, ALA (рН 7.0) (Sigma, США) и мелатонина готовили перед экспериментом. Агент добавляли в среду культивирования клеток из расчета получения следующих конечных концентраций: 10 мМ для NAC, 1.25 мМ для ALA, 1 мкМ для мелатонина. Клетки культивировали в присутствии агента 20—24 ч, затем агент удаляли, меняя среду культивирования на свежую, не содержащую добавки, после чего клетки культивировали еще 20—24 ч.

Клетки МГ22а в количестве $2 \cdot 10^5$ (в 250 мкл физиологического раствора) инъецировали под кожу в область спины мышам сингенной линии СЗНА. Мыши (массой 18—20 г) были получены из питомника «Рапполово» РАН (Санкт-Петербург). Мышей делили на 3 группы, в каждой из которых было не менее 10 животных. Первой группе инъецировали интактные клетки МГ22а (контроль), второй — клетки, которые культивировали в течение 20—24 ч в присутствии одного из агентов, третьей — клетки, которые после воздействия NAC, ALA или мелатонина культивировали еще 20—24 ч в среде, не содержащей агента. Концентрация клеток, инъецируемых под кожу, подобрана таким образом, чтобы в контрольной группе мышей опухоли возникали через 10 сут в 100 % случаев. За развитием опухолей наблюдали в течение 36 сут, после чего мышей, оставшихся к этому времени живыми, умерщвляли (согласно правилам эвтаназии). Объем опухоли V (мм³) рассчитывали по формуле

$$V = \frac{4}{3\pi} \left(\frac{L}{2} \right) \left(\frac{D}{2} \right)^2,$$

где L — максимальный, а D — минимальный диаметр опухоли (мм) (Хавинсон и др., 2001). Кроме того, регистрировали число мышей с привившейся опухолью и число погибших мышей. Достоверность различий объема опухоли в контроле и опыте оценивали с помощью t -критерия

Стьюдента при $P < 0.05$; разницу между долями погибших мышей — с помощью критерия χ^2 при $P < 0.05$.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали методом проточной цитометрии. Клетки культивировали в течение 1 сут в условиях голодания (в среде, содержащей 0.5 % сыворотки), затем обрабатывали NAC, ALA или мелатонином в полной среде (10 % сыворотки) по схеме, описанной выше (в начале раздела). Распределение клеток по фазам цикла изучали сразу после 24-часового действия агентов и через 24 ч после их удаления. Клетки снимали с поверхности чашек Петри смесью растворов трипсина и Версена в соотношении 1 : 2, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0.02 % сапонина, и окрашивали в течение 15 мин при 37 °С в буферном растворе, содержащем 40 мкг/мл иодида пропидия и 100 мкг/мл рибонуклеазы. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на двухлазерном проточном цитометре-сортировщике АТС 3000 (Brucker) при скорости анализа 1000 клеток в 1 с. Определение долей клеток, соответствующих по количеству ДНК фазам цикла G₀/G₁, S и G₂/M, проводили согласно модели Дина (Dean, 1985). В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток. Каждый эксперимент проводили в 3 повторностях. Результаты представлены средними значениями и их стандартными ошибками. Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Стьюдента при $P < 0.05$.

Результаты

При наблюдении за мышами после подкожного введения им клеток МГ22а регистрировали время образования опухоли, ее рост (объем) и гибель мышей. У контрольных мышей, которым инъецировали необработанные клетки, опухоли возникали на 10-е сут в 100 % случаев; гибель мышей начиналась на 24-е сут и достигала 67 % к концу срока наблюдения (36 сут). Если клетки до инъекции мышам культивировали в присутствии NAC (10 мМ), ALA (1.25 мМ) или мелатонина (1 мкМ) в течение 20—24 ч, то картина развития опухолей менялась. Эти изменения представлены в таблице. Действие всех трех агентов на клетки приводит к тому, что их прививаемость замедляется, и доля мышей с опухолью составляет на 10-е сут 40 % в случае NAC и 53 % в случае ALA. Действие мелатонина было еще более выразительно: опухоли начинали возникать только на 14-е сут, а к концу срока наблюдения они обнаруживались только у 80 % мышей. Замедлялся и рост самих опухолей (рис. 1, а). Через 20 сут (приблизительно в середине срока наблюдения) после инъекции мышам клеток, обработанных NAC, ALA или мелатонином, объем опухоли составлял 167.5, 84.3 и 26.1 мм³ соответственно против 513.8 мм³ у контрольных мышей. Эффективность торможения роста опухоли (ТРО) уменьшается по мере развития опухоли (см. таблицу). ТРО оценивали по разнице объема опухоли в контроле (V_k) и опыте (V_o) (ТРО = $(V_k - V_o) / V_k \cdot 100$ %). Существенно отодвигались и сроки гибели мышей в случае всех трех агентов, но самым выразительным действием обладал мелатонин. Так, доля погибших мышей к концу наблюдений (36 сут) составляла 20 и 53 % в случае обработки клеток соответственно NAC или ALA (против 67 % в контроле), а в случае мелатонина гибели мышей за это время не отмечали вообще (см. таблицу, рис. 2, а).

Развитие опухолей у мышей СЗНА после имплантации им клеток мышинной гепатомы МГ22а, обработанных антиоксидантом (NAC, ALA) или мелатонином

Воздействие	СОО (мм ³) через		Доля мышей с опухолью (%) через			Доля погибших мышей (%) через	
	10 сут	20 сут	10 сут	20 сут	36 сут	28 сут	36 сут
Контроль	4.2 ± 1.2	513.8 ± 114.3	100	100	100	13	67
+NAC	0.5 ± 0.3 (88.1 %)	167.5 ± 47.4 (67.3 %)	40	100	100	10	20
Удаление NAC	0.1 ± 0.0 (97.6 %)	60.7 ± 14.0 (88.2 %)	7	44	44	0	10
+ALA	0.9 ± 0.8 (78.5 %)	84.3 ± 9.1 (83.6 %)	53	95	100	0	53
Удаление ALA	0 (100 %)	33.5 ± 18.9 (93.4 %)	0	80	100	0	20
+Мелатонин	0 (100 %)	26.1 ± 6.9 (94.9 %)	0	60	80	0	0
Удаление мелатонина	0 (100 %)	61.8 ± 33.3 (88 %)	0	80	100	20	40

Примечание. Клетки инъецировали мышам под кожу через 24 ч после добавления агента (+) в среду культивирования или через 24 ч после того, как агент был удален сменой среды. СОО — средний объем опухоли. В графах для «СОО» в скобках указаны значения эффективности торможения роста опухоли (ТРО: см. раздел «Материал и методика»). В группе было от 10 до 22 мышей.

Для того чтобы понять, могут ли клетки, обработанные антиоксидантом (20—24 ч), сохранять приобретенные изменения какое-то время, их после культивирования в среде с испытываемым агентом культивировали в среде, не содержащей агента, в течение 20—24 ч и после этого инъецировали мышам. Результаты (см. таблицу) показывают, что в этих экспериментах в случае NAC и ALA все регистрируемые показатели не только не возвращаются к уровню контрольных клеток, но продолжают уменьшаться. Для случаев с удалением NAC доля мышей с опухолью за все время наблюдения не превышает 44 %, хотя для случаев с удалением ALA к концу наблюдения все мыши имели опухоли. Однако и в том, и в другом случае

рост опухолей замедлялся (рис. 1, б) и резко сокращалась смертность мышей (10 и 20 % к концу наблюдения для случаев удаления NAC и ALA соответственно; рис. 2, б). Эти данные свидетельствуют о том, что функциональные изменения клеток, возникшие в результате действия антиоксиданта, не только сохраняются, но и продолжают какое-то время и после удаления антиоксиданта. Этот вывод не относится к мелатонину. В ответ на его удаление клетки восстанавливают свои опухолевые потенции, и все измеряемые параметры приближаются к контрольным значениям, когда мышам инъецировали необработанные клетки (см. таблицу, рис. 2).

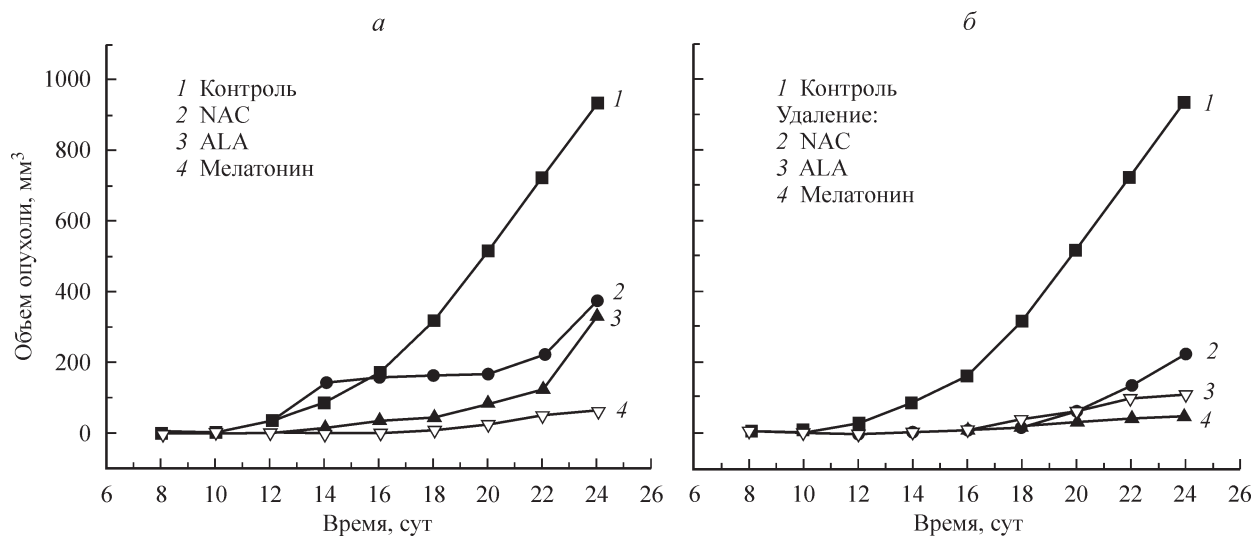


Рис. 1. Рост опухоли после инъекции мышам клеток МГ22а интактных (контроль), обработанных NAC, ALA или мелатонином.

а — клетки культивировали в присутствии агента в течение 24 ч, после чего сразу же вводили мышам (2—4); б — клетки культивировали в присутствии агента 24 ч, затем агент удаляли и культивировали еще 24 ч, после чего инъецировали мышам (2—4); а: данные достоверно отличаются от контрольных значений для временных точек 16—24 (ALA и мелатонин) и 18—24 (NAC) сут; б: все данные достоверно отличаются от контрольных значений для временных точек 16—24 (по *t*-критерию Стьюдента). Концентрации агента: 10 (NAC), 1.25 мМ (ALA) и 1 мкМ (мелатонин).

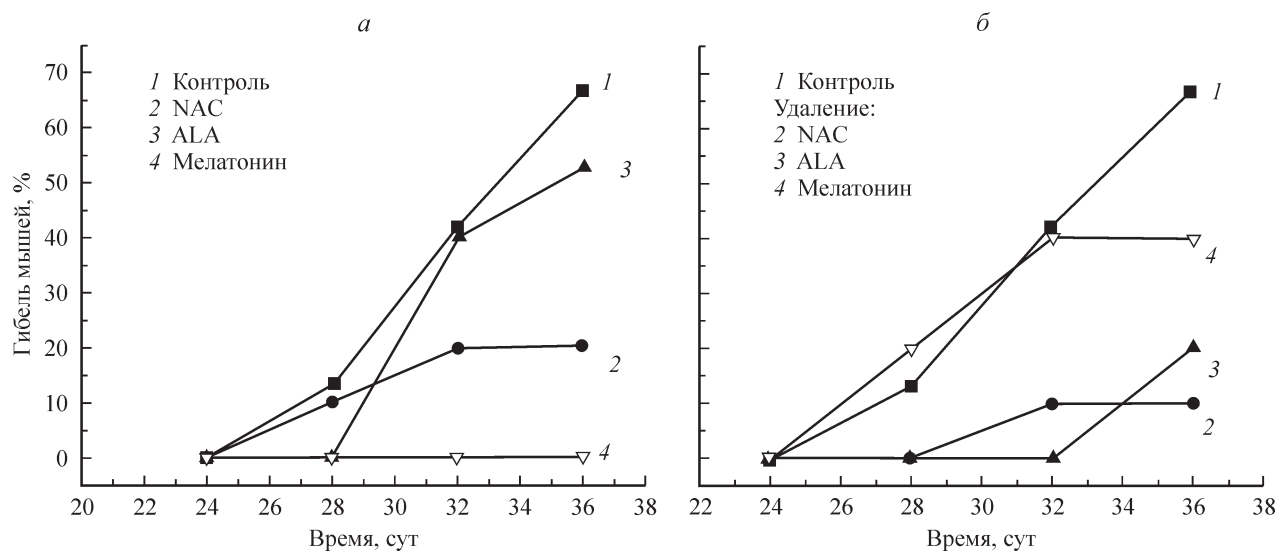


Рис. 2. Гибель мышей в результате инъекции им клеток МГ22а, обработанных NAC, ALA или мелатонином. *а, б* — см. подпись к рис. 1. Для временных точек 32 и 36 сут отличия от контроля достоверны (по критерию χ^2) в случае NAC и мелатонина (*а*) и в случае NAC, ALA (*б*).

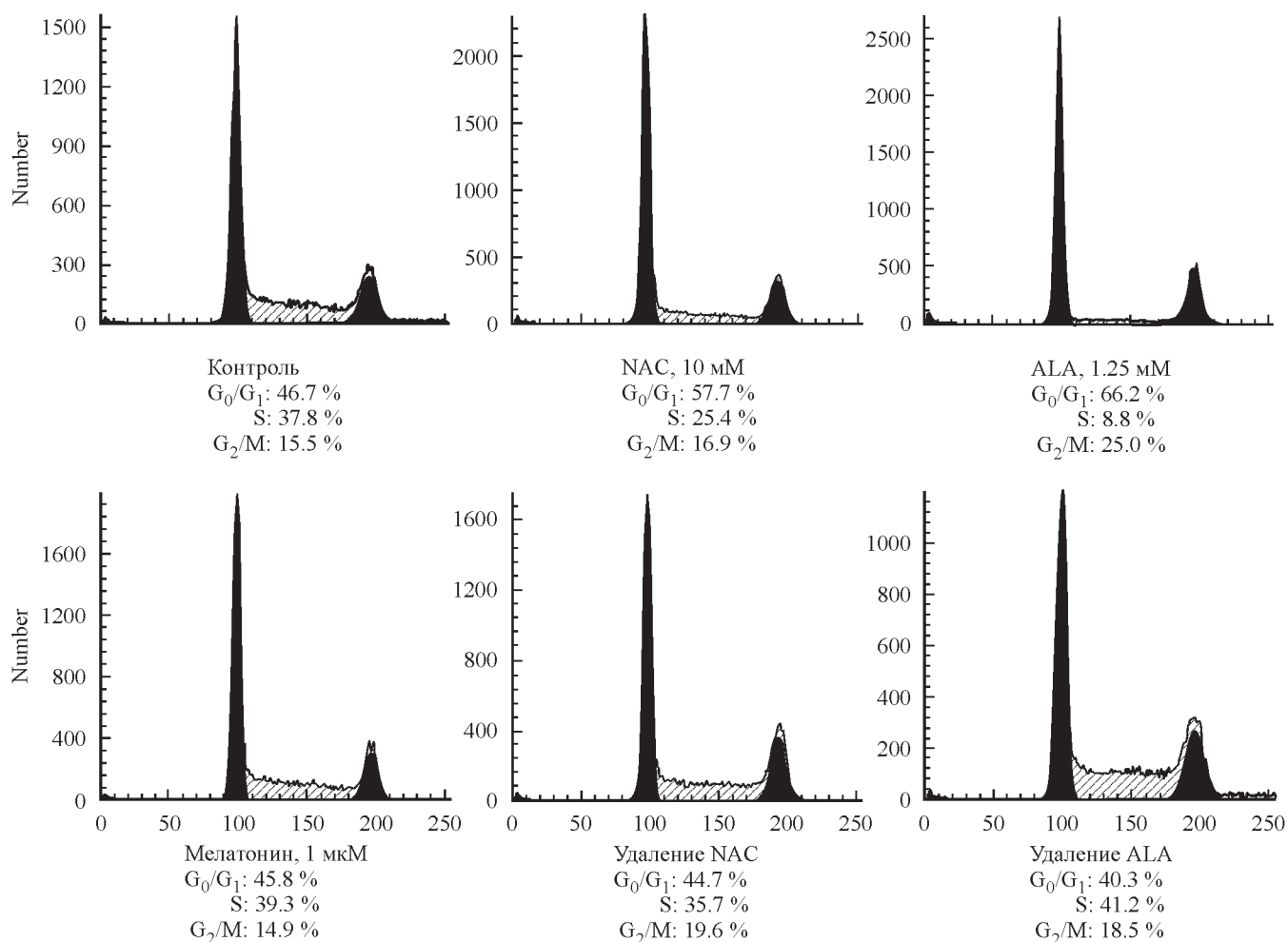


Рис. 3. Распределение клеток МГ22а по фазам клеточного цикла (G_0/G_1 , S и G_2/M) в контроле, через 24 действия NAC, ALA или мелатонина, а также через 24 ч после удаления агентов из среды культивирования.

По горизонтали — содержание ДНК, усл. ед.; по вертикали — число клеток.

Обнаруженные эффекты зависят от дозы агента, что подтверждается в экспериментах с NAC в меньшей концентрации — 2 мМ. Во всех вариантах экспериментов эффект не отличался от контрольного варианта (не показано).

Таким образом, клетки гепатомы МГ22а, обработанные антиоксидантом (NAC, ALA) или мелатонином, частично теряют туморогенность, что выражается в замедлении возникновения и развития у мышей опухолей и в уменьшении смертности животных.

Одной из возможных причин изменения функциональных свойств клеток в сторону нормализации при действии антиоксиданта или мелатонина может быть замедление пролиферации клеток. Для проверки этого предположения в экспериментах *in vitro* исследовали распределение клеток по фазам клеточного цикла во всех трех вариантах эксперимента: в контроле, после 24-часового действия агента и через 24 ч после удаления агента. Результаты показаны на рис. 3. Оказалось, что NAC и ALA замедляют пролиферацию клеток, задерживая их в фазе G_0 клеточного цикла (или на границе фаз G_0/G_1) и замедляя выход из фазы G_2 (что следует из изменения соотношения между фазами G_2/M и S). Так, после действия NAC доля клеток в синтетической фазе (S) цикла уменьшается до $26.98 \pm 0.81\%$ против $37.15 \pm 0.56\%$ в контроле. Цитостатическое действие ALA значительно сильнее, чем действие NAC. ALA блокирует переход клеток в фазу S цикла; доля клеток в S-фазе в этом случае составляет менее 10% (9.79 ± 0.56); клетки накапливаются в фазах G_0/G_1 ($62.46 \pm 2.00\%$ против $46.02 \pm 0.47\%$ в контроле) и G_2/M ($27.74 \pm 1.45\%$ против $16.83 \pm 1.03\%$ в контроле). Через 1 сут после удаления и NAC, и ALA клеточный цикл полностью восстанавливается (рис. 3), однако их уменьшенная туморогенность продолжает сохраняться (см. таблицу, рис. 1, б; 2, б). Что касается мелатонина, то мы не обнаружили каких-либо достоверных изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла (рис. 3).

Обсуждение

Мы показали, что клетки гепатомы МГ22а, подвергнутые действию NAC, ALA или мелатонина, уменьшают свои туморогенные качества, что свидетельствует о сдвиге их фенотипа в сторону нормализации. Используемые нами агенты принципиально различны и по структуре, и по механизму действия.

NAC широко известен как фармакологический препарат, характеризующийся муколитическим (расщепляет дисульфидные связи кислых мукополисахаридов), антиокислительным, антиоксидантным, иммуномодулирующим и антимуtagenным действием (Остроумова и др., 1994; Kelly, 1998). Проникая в клетки, NAC включается в синтез глутатиона, основного восстанавливающего компонента в клетке, что является основой его применения как антиоксиданта (Sochman, 2002). NAC может изменять активность транскрипционных факторов (Гончар и др., 2003; см. обзоры: Zafarullah et al., 2003; Parasassi et al., 2010), усиливать адгезию эпидермоидных клеток (Rivabene et al., 1995), блокировать клеточный цикл, снижать уровень свободных радикалов (Ferrari et al., 1995; Гамалей и др., 2003; Munoz et al., 2004), предотвращать канцерогенез, ингибировать инвазию и метастазирование опухолевых клеток (Aluigi et al., 2000; Kawakami et al., 2001). Подробное рассмотрение механизмов его возможного

биохимического действия как SH-реагента привело к заключению о его плейотропном действии, основным из которых является препятствие образованию дисульфидов, вовлеченных в функциональную передачу сигнала, и сдвиг редокс-баланса клетки (Parasassi et al., 2010).

В отличие от NAC ALA имеет окисленные SH-группы, но быстро восстанавливает их, образуя дигидролипоевую кислоту (DHLA) после проникновения в клетки. В связи с этим ALA привлекает большое внимание как не прямой (метаболический) антиоксидант (Packer et al., 1995). ALA в паре с DHLA меняет активность редокс-зависимых белков, удаляет активные формы кислорода и азота, а также их производные, предотвращает инициацию перекисного окисления липидов, восстанавливает окисленный глутатион (Whiteman et al., 1996; Han et al., 1997; Roy, Packer, 1998; Moini et al., 2002), влияя тем самым на биохимические и физиологические процессы в клетке.

Мелатонин — это гормон, регулятор биоритмов. Одно из его важных свойств — контролировать клеточное деление. Мелатонин может действовать и через рецепторы, и минуя их (Комаров и др., 2004). Рецепторы к мелатонину есть у разных клеток (Anisimov, Popovic, 2004; Dubocovich, 2007). Онкостатическое действие мелатонина известно, в его основе могут лежать разные причины, обнаруженные и *in vitro*, и *in vivo*. Это изменение пролиферации, адгезивности клеток, перестройки цитоскелета, изменение внутриклеточных сигнальных каскадов, изменение редокс-баланса, изменение метаболизма линолевой кислоты (Blask et al., 2002, 2004). Наличие рецепторного механизма действия отличает мелатонин от NAC и ALA, у которых мишеней множество, но нет универсальных.

Несмотря на это, сравнительный анализ результатов настоящей работы показывает, что и антиоксиданты, и мелатонин изменяют свойства клеток таким образом, что образование ими опухолей резко замедляется, а смертность мышей уменьшается (на фоне контроля). Наиболее эффективным оказался мелатонин, но действие его легко обратимо по сравнению с NAC и ALA. Эффективность NAC и ALA значительно меньше, и по результатам действия эти два антиоксиданта мало отличаются друг от друга. Интересно, что измененные свойства клеток сохраняются и после удаления NAC и ALA из среды культивирования. В этом случае клетки еще медленнее образуют опухоли, и еще более замедляется наступление гибели животных.

Молекулярные перестройки, вызванные действием NAC или ALA, приводят к более глубоким изменениям в клетке (по сравнению с мелатонином), которые быстро не прекращаются после окончания воздействия. Очевидно, удаление антиоксиданта из среды культивирования клеток не просто прекращает его действие (останавливает сигнал, как это, возможно, происходит в случае с мелатонином), а является новым событием (сигналом) для клетки. В результате клетка возвращается к исходному состоянию постепенно, но сигнальные пути в ответ на добавление антиоксиданта и его удаление разные. Поскольку NAC и ALA могут влиять на активность разных белков клетки, включая транскрипционные факторы, можно предполагать изменение синтеза одного или нескольких белков и соответственно изменения функций клеток и внутриклеточных сигнальных путей.

Потерю туморогенности клетками при действии NAC, ALA или мелатонина нельзя объяснить изменением

пролиферации клеток. NAC незначительно задерживает прохождение клеток по циклу, ALA полностью блокирует клеточный цикл, мелатонин в использованной концентрации не действует (рис. 3). К тому же эти изменения быстро обратимы, и после окончания воздействия клетки быстро восстанавливают характерное для контрольных условий прохождение по циклу. Таким образом, никакой корреляции между изменением пролиферативных и туморогенных свойств клеток МГ22а нет. Эти данные лишь подчеркивают множественность событий, вызванных действием каждого из агентов и разную степень их зависимости от этого действия (быстрая обратимость изменений клеточного цикла и стойкие изменения туморогенности).

Как мы показали ранее, в экспериментах *in vitro* NAC, ALA и мелатонин значительно уменьшают (почти до полной потери) чувствительность клеток МГ22а к литическому действию ЕКК, полученных от мышей той же линии СЗНА (Филатова и др., 2008, 2009; Гамалей и др., 2010а, 2010б). Это говорит о том, что клетки, обработанные NAC, ALA или мелатонином и затем инъецированные мышам, не могут подвергаться эффективному воздействию киллеров, во всяком случае в первое время после инъекции, которое могло бы замедлить образование опухоли. Измененный фенотип трансформированных клеток 3Т3-SV40 сохраняется не менее 2 сут (Филатова и др., 2006). Эксперименты с клетками МГ22а и развитием опухолей у мышей показали, что это время может быть гораздо больше, и клетки с уменьшенной туморогенностью в результате действия антиоксиданта или мелатонина возвращают свои опухолевые потенции очень постепенно.

Поскольку механизмы действия испытанных соединений разные, а их эффекты на функциональном уровне сходны, следует предполагать наличие каких-то общих итоговых молекулярных изменений, определяющих сходство фенотипических перестроек. Нами показано, что NAC и ALA быстро меняют активность матричных металлопротеиназ в среде культивирования клеток (Воронкина и др., 2008) и перестраивают актиновый цитоскелет трансформированных клеток (Ефремова и др., 2004; Вахромова и др., 2009; Гамалей и др., 2010б). Это неизбежно ведет к перестройке клеточной поверхности и внеклеточного матрикса и связанным с ними изменениям межклеточных коммуникаций и адгезивности. Все это может приводить к временному изменению и туморогенности клеток.

Представленные результаты по изменению фенотипа опухолевых клеток получены нами в экспериментах *in vitro*. Мыши, использованные нами (эксперименты *in vivo*), служили лишь моделью для наблюдения функциональных изменений клеток, которые произошли с ними *in vitro*, и мы не можем обсуждать участие организма животного в обнаруженном эффекте.

Тем не менее эти данные можно учитывать при разработке различных терапевтических схем, использующих антиоксиданты в качестве фармакологических агентов.

Авторы благодарны В. Н. Анисимову за предоставление мелатонина (НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Росмедтехнологий, Санкт-Петербург).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Анисимов В. Н., Попович И. Г., Забежинский М. А. 2004. Влияние мелатонина на процесс старения. В кн.: Мелатонин в норме и патологии. М.: Медпрактика. 223—232.
- Вахромова Е. А., Полозов Ю. С., Кирпичникова К. М., Аксенов Н. Д., Гамалей И. А. 2009. Действие альфа-липоевой кислоты на фибробласты 3Т3 и 3Т3-SV40. Сравнение с действием N-ацетилцистеина. Цитология. 51 (12) : 971—977.
- Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2008. Изменение активности матричных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология. 50 (10) : 879—883.
- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Действие агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3Т3 и 3Т3SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.
- Гамалей И. А., Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Филатова Н. А. 2010а. Молекулярно-физиологические механизмы действия антиоксидантов на трансформированные и эмбриональные клетки. В кн.: Биоантиоксидант. VIII Международная конференция: Тезисы докладов. М.: РУДН: 105—106.
- Гамалей И. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Филатова Н. А. 2010б. N-ацетилцистеин уменьшает чувствительность трансформированных и эмбриональных клеток к литическому действию естественных киллерных клеток. Цитология. 52 (7) : 555—561.
- Гельштейн В. И. 1971. Прогрессия перевиваемых мышинных гепатом. Цитология. 13 (1) : 3—14.
- Гончар И. В., Бутова Е. Б., Дорош В. Н., Гамалей И. А., Никольский Н. Н. 2003. Активация рецептора EGF и факторов STAT в зависимости от окислительно-восстановительного статуса клеток А431. Цитология. 45 (5) : 478—487.
- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403.
- Комаров Ф. И., Рапопорт С. И., Малиновская Н. К., Анисимов В. Н. (Ред.). 2004. Мелатонин в норме и патологии. М.: Медпрактика. 308 с.
- Остроумова М. Н., Коваленко И. Г., Берштейн Л. М. 1994. Возможность использования N-ацетилцистеина в профилактике рака. Эксперим. онкол. 16 (1) : 96—101.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Гамалей И. А. 2009. Влияние альфа-липоевой кислоты на чувствительность трансформированных фибробластов к литической активности естественных киллерных клеток. Сравнение с действием NAC. Цитология. 51 (5) : 398—402.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3Т3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—268.
- Хавинсон В. Х., Южаков В. В., Кветной И. М., Малинин В. В. 2001. Влияние эпителиона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1. Вопросы онкологии. 47 (4) : 461—465.
- Acuña-Castroviejo D., Escames G., Carozo A., Leon J., Khalid H., Reiter R.J. 2002. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. Curr. Topics Med. Chem. 2 : 133—152.
- Aluigi M. G., De Flora S., D'Agostini F., Albini A., Fassina G. 2000. Antiapoptotic and antigenotoxic effects of N-acetylcysteine in human cells of endothelial origin. Anticancer Res. 20 : 3183—3187.
- Anisimov S. V., Popovic N. 2004. Genetic aspects of melatonin biology. Rev. Neurosci. 15 : 209—230.

- Blask D. E., Dauchy R. T., Sauer L. A., Krause J. A. 2004. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytemelatonin. *Carcinogenesis*. 25 : 951—960.
- Blask D. E., Sauer L. A., Dauchy R. T. 2002. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2 : 113—132.
- Dean P. N. 1985. Methods of data analysis in flow cytometry. In: *Flow cytometry-instrumentation and data analysis*. New York: Acad. Press. 114—124.
- Dubocovich M. L. 2007. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med.* 8. Suppl 3 : 34—42.
- Ferrari G., Yan C. Y., Greene L. A. 1995. N-acetylcysteine (Dand L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.* 15 : 2857—2866.
- Finkel T., Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408 : 239—247.
- Gamaley I. A., Klyubin I. V. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.* 188 : 203—255.
- Han D., Sen C. K., Roy S., Kobayashi M. S., Tritschler H. J., Packer L. 1997. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Amer. J. Physiol.* 273 : R1771—R1778.
- Kawakami S., Kageyama Y., Fujii Y., Kihara K., Oshima H. 2001. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on invasion and MMP-9 production of T24 human bladder cancer cells. *Anticancer Res.* 21 : P. 213—219.
- Kelly G. S. 1998. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* 3(2) : 114—127.
- Kimura H., Sawada T., Oshima S., Kozawa K., Ishioka T., Kato M. 2005. Toxicity and roles of reactive oxygen species. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 4 : 489—495.
- Mikhelson V. M., Gamaley I. A. 2008. Telomere shortening is the sole mechanism of aging. *Open Aging J.* 2 : 30—38.
- Moini H., Packer L., Saris N. E. 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182 : 84—90.
- Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23 : 255—259.
- Munoz A. M., Rey P., Soto-Otero R., Guerra M. J., Labandeira-Garcia J. L. 2004. Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *J. Neurosci. Res.* 76 : 551—562.
- Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 19 : 227—250.
- Parasassi T., Brunelli R., Costa G., De Spirito M., Krasnowsk E. K., Lundeberg T., Pittaluga E., Ursini F. 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Scientific World J.* 10 : 1192—1202.
- Rahimi R., Nikfar S., Larjani B., Abdollahi M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother.* 59 : 365—373.
- Reiter R. J., Tan D., Mayo J. C., Sainz R. M., Leon J., Czarnocki Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50 : 1129—1146.
- Rivabene R., Viora M., Matarrese P., Rainaldi G., D'Ambrosio A., Malorni W. 1995. N-acetyl-cysteine enhances cell adhesion properties of epithelial and lymphoid cells. *Cell Biol. Int.* 19 : 681—686.
- Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R. J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36 : 1—9.
- Roy S., Packer L. 1998. Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors.* 8 : 17—21.
- Sochman J. 2002. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?! *J. Amer. Coll. Cardiol.* 39 : 1422—1428.
- Tylicki L., Rutkowski B., Hörl W. H. 2003. Antioxidants: a possible role in kidney protection. *Kidney Blood Press Res.* 26 : 303—314.
- Whiteman M., Tritschler H., Halliwell B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and α_1 -antitrypsinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. *FEBS Lett.* 379 : 74—76.
- Zafarullah M., Li W. Q., Sylvester J., Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *CMLS Cell Mol. Life Sci.* 60 : 6—20.

Поступила 16 XII 2010

DECREASE IN TUMORIGENIC ACTIVITY OF MURINE HEPATOMA CELLS AFTER TREATMENT WITH ANTIOXIDANTS AND MELATONIN

N. A. Filatova, K. M. Kirpichnikova, N. D. Aksenov, E. A. Vakhromova, I. A. Gamaley¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

We studied the effect of antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC, 10 mM) and alpha-lipoic acid (ALA, 1.25 mM) and of the hormone melatonin (1 μ M) on the ability of murine hepatoma cells MH22a to develop tumors in syngenic mice (C3HA) after subcutaneous injection. Tumor formation and development slowed down and mouse mortality decreased when the injected cells were pretreated by NAC, ALA or melatonin during 20 h. Melatonin had the most marked effect. Tumors appeared in 100 % cases after 10 days in control mice when untreated cells had been injected; injection of cells pretreated by NAC or ALA resulted in tumor formation only in 40 and 53 % of mice, respectively. When cells were pretreated with melatonin the tumors appeared only in 18—20 days after injection. Until the end of the observation (36 days) 67 % of control mice died, but when the cells were pretreated by NAC or ALA mouse death-rate was 20 and 53 %, respectively. In the case of melatonin we did not observed any dead mice at all. We showed that treatment by antioxidants delayed (NAC) or completely inhibited (ALA) cell cycle of hepatoma cells. Cell cycle was restored after removal of the antioxidants. Melatonin did not change cell cycle phase distribution. We conclude that there is no direct correlation between loss of tumorigenic properties and changing of proliferative activity of hepatoma cells. Different mechanisms of antioxidants and melatonin action resulting in transient tumor phenotype normalization are discussed.

Key words: tumorigenic cells MH22a, murine hepatoma, N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, melatonin, cell cycle.