

КРУПНОМАСШТАБНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК И ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БИНАРНОЙ СИСТЕМЫ АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА—МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ КОБАЛЬТА IN VITRO

© А. И. Медведев, В. В. Лещенко

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино, Московская обл.;
электронный адрес: bezlepkin@iteb.ru*

Крупномасштабные фрагменты ДНК являются маркерами раннего этапа апоптоза, индуцируемого в клетках эукариот разными по природе цитотоксинами. Изучали динамику развития крупномасштабной фрагментации ДНК при действии противоопухолевого средства — бинарной системы аскорбиновая кислота—фталоцианин кобальта — на лейкемические клетки К-562 в течение 48 ч инкубации, соответствующих двум периодам удвоения числа клеток в растущих контрольных культурах. Показано, что генерируемая системой перекись водорода вызывает образование фрагментов ДНК длиной от 2200 до 50 тыс. п. о. в первые часы инкубации. Позднее обнаружена гибель клеток, сопровождающаяся снижением содержания фрагментированной ДНК. В течение 24 ч инкубации остается нерепарированной часть фрагментированной ДНК; через 48 ч наблюдается задержка или замедленная пролиферация клеток К-562, отличающихся от контрольных также высоким уровнем гибели и повышенным содержанием крупномасштабных фрагментов ДНК.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, опухолевые клетки, противоопухолевые средства, перекись водорода, крупномасштабные фрагменты ДНК, нестабильность генома, эпигенетические повреждения.

Принятые сокращения: АК — аскорбиновая кислота, п. о. — пара оснований, ТФ — терафтал (фталоцианин кобальта), ЭТФ — этерифицированный терафтал.

К химическим нуклеазам относят редокс-активные координационные комплексы, способные при физиологических условиях вызывать образование разрывов в нуклеиновых кислотах (Sigman, 1990). Особый интерес представляют используемые в онкологии природные металлокомплексы типа блеомицина и его аналогов (Sikic, 1986; Kasper, Barth, 2009), а также бинарные каталитические системы на основе металлокомплексов кобальта с корриновым (оксикобаламин, или витамин В_{12b}) и фталоцианиновым (терафтал, или ТФ) лигандами в сочетании с аскорбиновой кислотой (АК), катализирующие расщепление нуклеиновых кислот при участии активных форм кислорода (Вольпин и др., 1988, 1998; Кнорре и др., 1993) и оказывающие цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки *in vitro* и на опухоли *in vivo* (Чиссов и др., 2000).

При изучении цитотоксического действия бинарных систем установлено, что обе каталитические системы вызывают образование крупномасштабных фрагментов ДНК (Медведев и др., 2001а; Медведев, Лещенко, 2008) и повреждение окислительно-восстановительной системы опухолевых клеток, индуцируя окисление глутатиона (Akatov et al., 2000). Через 1 ч воздействия доля фрагментированной ДНК (Медведев и др., 2001б) и окисленного глутатиона (Акатов и др., 2001) составила около 50 %, достигая 90 % через 4—5 ч инкубации. Позднее обнаружено резкое уменьшение кальциевой емкости митохондрий,

увеличение содержания эндогенной перекиси водорода и образование олигонуклеосомных фрагментов ДНК (Акатов и др., 2003, 2005). Показано, что генотоксическое действие (Медведев и др., 2005) использованной в низкой концентрации системы ТФ + АК обратимо, а крупномасштабные фрагменты ДНК, индуцированные обеими системами на раннем этапе апоптоза опухолевых клеток, воссоединяются существенно медленнее, чем вызванные γ -облучением в дозе, адекватной по уровню поврежденности ДНК (Медведев и др., 2001а; Медведев, Лещенко, 2008).

Целью работы являлось изучение динамики развития крупномасштабной фрагментации ДНК при сочетанном действии АК с модифицированным фталоцианиновым лигандом ЭТФ на лейкемические клетки человека К-562 в течение 48 ч инкубации, соответствующей двум периодам удвоения числа клеток в растущих контрольных культурах.

Материал и методика

Использовали клетки миелоидной лейкемии человека линии К-562, полученной из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 40 мкг/мл гентамицина и 10 % эмбриональной те-

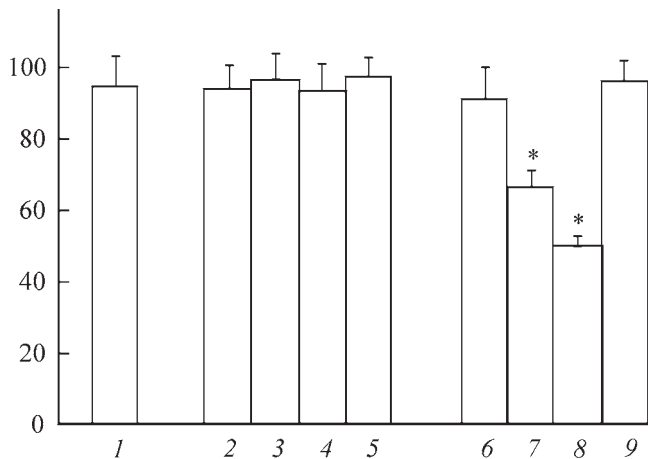


Рис. 1. Содержание высокомолекулярной ДНК в клетках К-562 в зависимости от условий инкубации.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки, 2 — 10 мкМ ЭТФ, 3 — 100 мкМ ЭТФ, 4 — 20 мкМ АК, 5 — 100 мкМ АК, 6 — 1 мкМ ЭТФ + 20 мкМ АК, 7 — 3 мкМ ЭТФ + 60 мкМ АК, 8 — 5 мкМ ЭТФ + 100 мкМ АК, 9 — 5 мкМ ЭТФ + 100 мкМ АК + 200 ед./мл каталазы; по вертикали: содержание высокомолекулярной ДНК, доля от общего количества ДНК, %; звездочка — $P < 0.05$ по сравнению с контрольными клетками.

лячьей сыворотки при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для изучения генотоксического действия ЭТФ использовали сочетание АК с пропиленовым эфиром окта-4,5-карбоксифталоциана кобальта, включенного в комплекс с пропиленовым эфиром циклодекстрина (ГНЦ НИОПИК).

Клетки высевали в культуральные флаконы (50 тыс. кл./мл), через 1 сут после посева добавляли ЭТФ и АК в молярном соотношении 1 : 20 и инкубировали в течение указанного времени. Пробу, содержащую около 500 тыс. клеток, осаждали центрифугированием (600 г, 2 мин), дважды промывали фосфатно-солевым буфером Дальбекко, центрифугуя в указанных условиях, и использовали для определения выживаемости и фрагментации ДНК. Добавление каталазы, определение кинетики клеточной гибели выполняли, как указано ранее (Акатов и др., 2005). Для определения кинетики клеточной гибели подсчитывали с помощью гемоцитометра число живых и погибших клеток через определенные интервалы времени после добавления веществ. Гибель клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим.

При анализе фрагментации ДНК (Lobrich et al., 1996) клетки заключали в легкоплавкую агарозу Т7. Лизис и переваривание ферментами включенных в агарозу клеток исключают фрагментацию высокомолекулярной ДНК, наблюдаемую при лизисе клеток в суспензии. Агарозный блок, содержащий около 150 тыс. клеток, импрегнировали в ячейку 1%-ного геля агарозы 1-В длиной 14 см и проводили пульс-электрофорез (Lalande et al., 1987) в течение 72 ч. Окрашивание фрагментированной ДНК в геле бромистым этидием проводили при концентрации 0.5 мкг/мл в течение 1 ч. Полученные электрофореграммы состояли из двух фракций. Фракция высокомолекулярной ДНК оставалась в ячейке для внесения образца, а крупномасштабная ДНК с размерами 2200 тыс. п. о. и менее мигрировала из ячейки. Величину фрагментации ДНК измеряли на сканирующем флуориметре, рассчитывая содержание фрагментированной ДНК от общего количества ДНК в дорожке геля (Медведев, Лещенко, 2008). Эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях;

полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Использованные реактивы: среда RPMI-1640, аскорбиновая кислота, протеиназа К, агароза Т7 и 1-В, этидий бромид, пульс-маркер хромосом *Saccharomyces cerevisiae*, рестрикт Hind III (Sigma, США); эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США); каталаза (MPbiochemicals, США).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные по изучению генотоксического действия бинарной смеси ЭТФ и АК и ее компонентов на лейкемические клетки К-562; условия инкубации выбраны с учетом результатов, полученных ранее с системой ТФ и АК. Как видно, ЭТФ и АК, использованные в отдельности в концентрациях до 100 мкМ (рис. 1, столбцы 2—5), как и бинарная система 1 мкМ ЭТФ и 20 мкМ АК (рис. 1, б), не вызывают деградации ДНК в сравнении с контрольными клетками. При увеличении концентрации бинарной системы в 3 и 5 раз (рис. 1, столбцы 7, 8) наблюдали значительное снижение содержания высокомолекулярной ДНК, достигающее примерно 30 и 50 % соответственно. Внесение в инкубационную среду каталазы совместно с ЭТФ (5 мкМ) и АК (100 мкМ) (рис. 1, столбец 9) предотвращает нуклеазное действие бинарной системы.

Спектр крупномасштабных фрагментов ДНК, образующихся при 6-часовой инкубации клеток К-562 с системой 5 мкМ ЭТФ + 100 мкМ АК, приведен на флуорограмме (рис. 2). Спектр включает в себя фрагменты с размерами от 2200 до 50 тыс. п. о. с двумя максимумами — между 2200 и 1100 тыс. п. о. и при 50 тыс. п. о., соответствующих по размеру «петлям» ДНК, что обусловлено деградацией более высокомолекулярных структур хроматина — «витков» спирали и «розеток» (Filipski et al., 1990). Образования в экспериментах олигонуклеосомных фрагментов ДНК не наблюдали, поскольку лейкемические клетки К-562 резистентны по этому признаку апоптоза к воздействию большого числа генотоксинов различной химической и физической природы (McGahan et al., 1994).

Динамика изменения содержания фрагментированной ДНК и количества живых клеток К-562 после добавления в культуру системы 5 мкМ ЭТФ + 100 мкМ АК приведены на рис. 3, а. Видно, что уже через 1 ч инкуба-

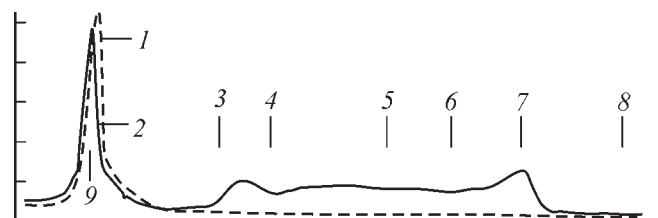


Рис. 2. Флуорограмма крупномасштабных фрагментов ДНК клеток К-562, разделенных пульс-электрофорезом в 1%-ном агарозном геле.

По горизонтали — распределение фрагментов ДНК по гелю; по вертикали — интенсивность флуоресценции, отн. ед. 1 — контрольные клетки; 2 — клетки, инкубированные 6 ч с 5 мкМ ЭТФ + 100 мкМ АК; 3—6 — маркеры *Saccharomyces cerevisiae* размерами 2200, 1100, 555 и 295 тыс. п. о.; 7 — положение фага λ размером 48 тыс. п. о.; 8 — положение рестрикта Hind III размером 9.4 тыс. п. о.; 9 — положение центра ячейки для внесения образца.

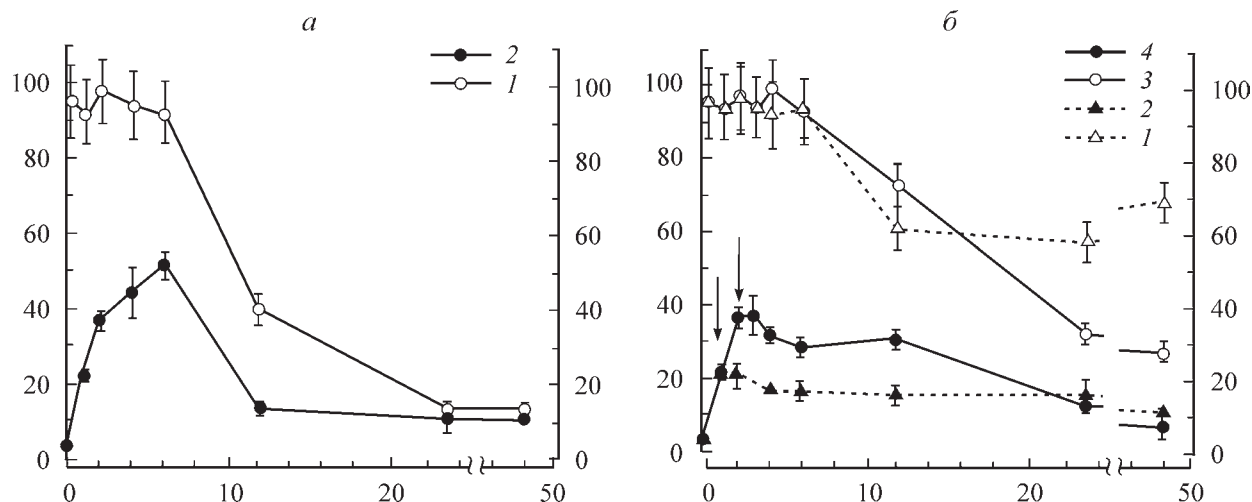


Рис. 3. Динамика изменения содержания фрагментированной ДНК и количества живых клеток К-562 после добавления в культуру 5 мкМ ЭТФ и 100 мкМ АК (а) и последующего добавления 200 ед./мл каталазы (б).

По оси абсцисс — время после добавления ЭТФ и АК, ч; по оси ординат: слева — доля фрагментированной ДНК от ее общего количества, %; справа — выживаемость, %. а: 1 — клетки, 2 — ДНК; б — добавление каталазы (стрелки) через 1 и 2 ч после внесения агентов; 1 и 2 — соответственно клетки и ДНК через 1 ч; 3 и 4 — соответственно клетки и ДНК через 2 ч.

ции содержание фрагментированной ДНК составляет 20 %, достигает максимума в 50 % через 6 ч (рис. 3, а, кривая 2), не оказывая достоверного цитотоксического действия (рис. 3, а, кривая 1). При продолжении инкубации наблюдается резкое уменьшение количества как живых клеток, так и фрагментов крупномасштабной ДНК, достигающее примерно 10 % через 24 ч инкубации и сохраняющееся на том же уровне через 48 ч.

Для уменьшения эффективности цитотоксического и генотоксического действия бинарной системы, обусловленного генерацией перекиси водорода (рис. 1, 9), добавляли в среду с клетками каталазу через 1 и 2 ч от начала инкубации. Из представленных данных (рис. 3, б, кривые 1, 3 в сравнении с рис. 3, а, кривая 1) видно, что уменьшение длительности инкубации с продуцирующей перекись системой существенно увеличивает выживаемость клеток К-562. Через 1 ч воздействия бинарной системы, вызывающей накопление в среде 110 мкМ H_2O_2 в течение первых 15 мин и снижающейся до уровня в 50 мкМ H_2O_2 в последующие 45 мин (Акатов и др., 2005), количество живых клеток снижается на 40 % в течение 24 ч инкубации, но не удваивается в течение следующего периода (рис. 3, б, кривая 1). Это может указывать на замедление пролиферации клеток К-562, вызванное окислительным стрессом. Добавление каталазы уменьшает накопление фрагментированной ДНК (рис. 3, б, кривые 2, 4 в сравнении с рис. 3, а, кривая 2), блокируя в первые часы инкубации нуклеазное действие бинарной системы. Через 24 ч инкубации остается нерепарированной, а возможно, и вновь образованной в результате увеличенной генерации перекиси водорода поврежденными окислительным стрессом митохондриями (Акатов и др., 2003; Santos et al., 2003) около 15 % фрагментированной ДНК. Существенно, что и через 48 ч инкубации (рис. 3, б, кривые 2, 4) наблюдается примерно такой же уровень содержания крупномасштабных фрагментов ДНК, что может объясняться также и вкладом нестабильности генома, которая инициируется экзогенной H_2O_2 , способной превращать топоизомеразу II в ДНК-расщепляющую нуклеазу в результате окисления ее тиольных групп. Это в свою очередь вызывает как образование крупномасштабных фрагментов ДНК, так и апоп-

тотическую гибель клеток и (или) нестабильность генома (Li et al., 1999; Li, Liu, 2001).

Очевидно, что цитотоксическое действие индуцируемой бинарными системами перекиси водорода не ограничивается наблюдаемыми в данной работе и других исследованиях крупномасштабной фрагментацией ДНК, истощением глутатиона, нарушением функции митохондрий (Higushi, 2003; Cai et al., 2008). Возникший окислительный стресс вызывает повреждения и других компонентов хроматина — белков, липидов и ядерных мембран, что также способствует образованию фрагментов хромосомной ДНК (Higuchi, 2004), нестабильности генома (Weinberg, Chandel, 2009) и, возможно, затрудняет воссоединение крупномасштабных фрагментов ДНК, индуцированных разными механизмами.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. В. С. Акатову и проф. Э. И. Лежневу за содействие в организации и обсуждение работы, а также цитотехнологу И. Д. Пшикиной и инженеру В. А. Шлектареву за участие в экспериментах.

Список литературы

- Акатов В. С., Леценко В. В., Евтодченко Ю. В., Круглов А. Г., Теплова В. В., Керамова А. Х., Якубовская Р. И. 2001. Повреждение окислительно-восстановительной системы и гибель опухолевых клеток в результате действия аскорбиновой кислоты в сочетании с фталоцианином кобальта. *Вопр. биол. мед. фарм. химии.* 3 : 32—36.
- Акатов В. С., Медведев А. И., Соловьева М. Е., Меркушина А. В., Леценко В. В. 2005. Апоптотическая гибель клеток лимфолейкоза человека HL-60 в результате сочетанного действия пропиленгликолевого эфира окта-4,5-карбоксифталоцианина кобальта и аскорбата. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 140 (12) : 684—687.
- Акатов В. С., Соловьева М. Е., Леценко В. В., Теплова В. В. 2003. Окислительный стресс в клетках карциномы гортани человека HEP-2 в результате действия сочетания витаминов B_{12} и С. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 136 (9) : 318—321.
- Вольпин М. Е., Кнорре Д. Г., Новодарова Г. Н., Тувин М. Ю., Федорова О. С., Фролова Е. И. 1988. Хелатные комплексы ко-

бальта как катализаторы расщепления цепей ДНК. ДАН СССР. 298 (2) : 363—366.

Вольпин М. Е., Крайнова Н. Ю., Левитин И. Я., Мутяева З. Я., Новодарова Г. Н., Оганезов В. К., Панкратов А. А., Чиссов В. И., Якубовская Р. И. 1998. Соединения ряда В₁₂ в сочетании с аскорбиновой кислотой как потенциальные противоопухолевые агенты. Рос. хим. журн. 42 (5) : 511—516.

Кнорре Д. Г., Федорова О., Фролова Е. И. 1993. Окислительная деградация нуклеиновых кислот. Успехи химии. 62 (1) : 70—91.

Медведев А. И., Акатов В. С., Евтодиенко Ю. В., Лещенко В. В., Соловьева М. Е., Лежнев Э. И., Якубовская Р. И. 2001а. Деградация и репарация ДНК в клетках эпидермоидной карциномы гортани человека НЕР-2 при совместном действии витамина В_{12b} и аскорбиновой кислоты. Цитология. 43 (3) : 274—277.

Медведев А. И., Акатов В. С., Крещенко Н. Д., Соловьева М. Е., Лещенко В. В., Лежнев Э. И., Якубовская Р. И. 2001б. Витамин В_{12b} в сочетании с аскорбиновой кислотой вызывает деградацию ДНК в опухолевых клетках *in vitro*. Бюлл. эксп. биол. мед. 131 (4) : 434—436.

Медведев А. И., Лещенко В. В. 2008. Крупномасштабная фрагментация и репарация ДНК при воздействии на опухолевые клетки генераторов активных форм кислорода — γ -облучения и системы аскорбиновой кислота—металлокомплексы кобальта. Бюл. эксперим. биол. мед. 145 (5) : 538—541.

Медведев А. И., Лещенко В. В., Ревина Г. И., Акатов В. С. 2005. Фрагментация ДНК и гибель лейкемических клеток К-562 в результате действия аскорбиновой кислоты в сочетании с фталоцианином кобальта. Вопр. биол. мед. фарм. химии. 4 : 15—18.

Чиссов В. И., Якубовская Р. И., Панкратов А. А., Кармакова Т. А., Трапезников Н. Н., Герасимова Г. К., Трецалина Е. М., Жукова О. С., Ворожцов Г. Н., Калия О. Л., Лукьянец Е. А., Левитин И. Я. 2000. Бинарные каталитические системы как новые противоопухолевые средства. Рос. онкол. журн. 6 : 23—26.

Akatov V. S., Evtodienko Y. V., Leschenko V. V., Teplova V. V., Potselueva M. M., Kruglov A. G., Legnev E. I., Yakubovskaya R. I. 2000. Combined vitamins В_{12b} and C induce the glutathione depletion and the death of epidermoid human larynx carcinoma cells НЕР-2. Biosci. Rep. 20 : 411—417.

Cai Y. J., Lu J. J., Zhu H., Xie H., Huang M., Lin L. P., Zhang X. W., Ding J. 2008. Salvicine triggers DNA double-strand breaks and apoptosis by GSH-depletion-driven H₂O₂ generation

and topoisomerase II inhibition. Free Radic. Biol. Med. 45 : 627—635.

Filipski J., Leblanc J., Youdate T., Sikorska M., Walker P. R. 1990. Periodicity of folding in higher order chromatin structures. EMBO J. 9 : 1319—1327.

Higushi Y. 2003. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 66 : 1527—1535.

Higuchi Y. 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. J. Cell. Mol. Med. 8 : 455—464.

Kasper M., Barth K. 2009. Bleomycin and its role in inducing apoptosis and senescence in lung cells—modulating effects of caveolin-1. Curr. Canc. Drug Target. 9 : 341—353.

Lalande M., Noolandi J., Turmel C., Rousseau J., Slater C. W. 1987. Pulsed-field electrophoresis: application of a computer model to the separation large DNA molecules. PNAS. 84 : 8011—8015.

Li T.-K., Chen A. Y., Yu C., Mao Y., Wang H., Liu L. F. 1999. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. Genes Develop. 13 : 1553—1560.

Li T.-K., Liu L. F. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41 : 53—77.

Lobrich M., Cooper P. K., Rydberg B. 1996. Non-random distribution of DNA double breaks induced by particle irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 70 : 493—503.

McGahon A., Besonette R., Schmitt M., Cotter K. M., Green D. R., Cotter T. G. 1994. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. Blood. 83 : 1179—1187.

Santos J. H., Hunakova L., Chen Y., Borner C., Houten B. V. 2003. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. J. Biol. Chem. 278 : 1728—1734.

Sigman D. S. 1990. Chemical nucleases. Biochemistry. 29 : 9097—9105.

Sikic J. 1986. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. Canc. Surv. 5 : 81—91.

Weinberg F., Chandell N. S. 2009. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. Cell. Mol. Life Sci. 66 : 3663—3673.

Поступила 11 VIII 2011

LARGE-SCALE FRAGMENTATION OF DNA AND THE DEATH OF TUMOR CELLS BY THE ACTION OF THE BINARY SYSTEM ASCORBIC ACID—METALLOCOMPLEXES OF COBALT *IN VITRO*

A. I. Medvedev, V. V. Leschenko

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino; Moscow region;
e-mail: bezlepkin@iteb.ru

High-molecular-weight DNA fragments are the markers of the early stage of apoptosis induced in eukaryotic cells by cytotoxins of different nature. The dynamics of the development of large-scale DNA fragmentation in K-562 leukemia cells by the action of the antitumor drug, the binary system ascorbic acid—cobalt phthalocyanine within 48 h of incubation, which correspond to two periods of the doubling of cell number in growing control cultures, have been studied. It was shown that, within the first hours of incubation, hydrogen peroxide generated by the system induces the formation of DNA fragments from 2200 to 50 kbp long. Later on the cell death accompanied by a decrease in the content of fragmented DNA is observed. Within 24 h of incubation, part of fragmented DNA remains unrepaired; after 48 h of incubation, a delay or a slowed down proliferation of K-562 cells, which differ from control cells also by a high level of death and a higher content of high-molecular-weight DNA fragments, is observed.

Key words: ascorbic acid, tumor cells, antitumor drugs, hydrogen peroxide, high-molecular-weight DNA fragments, genome instability, epigenetic damage.