

ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АПОПТОЗА У КРЫС С КАРЦИНОСАРКОМОЙ WALKER 256 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Елена Владимировна ОВСЯНКО¹, Игорь Дмитриевич САФРОНОВ^{1,2}, Яхид Умеровна ОВСЯНКО¹

¹ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

²Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе изучены показатели активности процессов перекисного окисления липидов и апоптоза у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии общей гипертермии (43,5 °С). Полученные данные свидетельствуют, что при воздействии общей гипертермии в организме крыс с карциносаркомой Walker 256 развивается окислительный стресс, индуцирующий апоптоз клеток опухолевой ткани, что подтверждается повышением экспрессии промоторов апоптоза Bax и Bad. Обсуждаются возможные механизмы запуска апоптоза злокачественных клеток при воздействии общей гипертермии.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, апоптоз, общая гипертермия.

Современный исследовательский интерес к молекулярным механизмам регуляции процессов пролиферации и апоптоза клеточных структур организма связан не только с углубленным изучением патогенеза злокачественных заболеваний, но и с поиском новых технологий коррекции нарушений программ клеточного деления и дифференцировки.

Известно, что метаболический фон клетки зависит от характера сигналов, поступающих из окружающей среды. Носителями информации являются первичные мессенджеры (гормоны, цитокины), действие которых осуществляется за счет сигнальной трансдукции [1]. В передаче сигнала через клеточную мембрану участвуют вторичные мессенджеры, прежде всего активные формы кислорода и азота (O_2^- , $\cdot OH$, $NO\cdot$ и др.), также регулирующие процессы пролиферации и апоптоза [2]. Если рассматривать свободные радикалы с позиций их действия в физиологических концентрациях в качестве вторичных посредников, то их образование при передаче сигнала должно быть опосредовано лиганд-рецепторным взаимодействием, где в качестве лигандов выступают гормоны и цитокины. Имеются подтверждения участия активных форм кислорода и азота в передаче сигнала, связанного с действием первичных мессенджеров, которые, осуществляя регуляцию уровня свободных радикалов, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), с одной стороны, и снижая активность ряда компонентов антиоксидантной системы, с другой, влияют на ключевые звенья метаболических процессов

в клетке [3]. Баланс прооксидантных и антиоксидантных систем является важным аспектом молекулярных механизмов передачи апоптотических сигналов, поскольку активность транскрипционных факторов и киназных ферментативных каскадов зависит от его состояния. Прямая причастность свободнорадикальных соединений к индукции апоптоза была ранее показана на примере нормальных и опухолевых клеток *in vitro* [4]. Отмечено, что опухолевые клетки часто содержат низкие концентрации активных форм кислорода в сочетании с относительно высоким уровнем антиоксидантов и активностью протеинкиназы С [5]. Установлено, что α -токоферол ингибирует активность протеинкиназы С за счет предотвращения аутофосфорилирования, которое необходимо для активации или дефосфорилирования протеинкиназы С протеиновой фосфатазой 2A [6]. Среди аналогов витамина Е сукцинат α -токоферола, считается мощным апоптогеном, механизм действия которого использует пути передачи сигналов, связанные с TGF- β , Fas, MAPK и сцепленным с TNF α опухолы лигандом Apo2 [7, 8]. Эти данные дают основание считать, что большое значение в регуляции апоптоза имеют активность свободнорадикальных реакций и состояние антиоксидантной системы.

В настоящее время установлено, что в нарушениях регуляции апоптоза, приводящих к прогрессированию опухолевых заболеваний, одно из центральных мест принадлежит экспрессии и функциональной активности белков семейства Bcl-2, которые при-

Овсянко Е.В. — к.м.н., доцент, e-mail: Vin_San92@mail.ru

Сафронов И.Д. — д.м.н., проф. кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии

Овсянко Я.У. — к.м.н., e-mail: Vin_San92@mail.ru

нимают участие в реализации внутреннего (митохондриального) пути апоптоза [9]. Белки семейства Bcl-2 подразделяют на проапоптотические (Bax, Bad) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-X_L). Биологическая роль этих белков до сих пор точно не установлена, хотя обнаружено, что они принимают участие в формировании ионопроводящих пор в мембране митохондрий, образуя для этого димеры и олигомеры. Считается, что при развитии окислительного стресса возможны значительное падение и/или потери мембранного потенциала митохондрий, которые могут иметь необратимый характер. В результате этих изменений возможен выход цитохрома *c* из межмембранного митохондриального пространства в цитозоль, его связывание с апоптозаактивирующим фактором-1 (Araf-1) и формирование комплекса с каспазой-9, которая запускает каскад протеолитических реакций и активирует другие каспазы, участвующие в реализации механизмов апоптотической гибели клеток [10].

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют, что в развитии опухолей существенную роль играют как характер протекания свободнорадикальных реакций, так и состояние апоптоза. С другой стороны, использование химических и физических методов противоопухолевой терапии часто подразумевает направленную регуляцию активности этих процессов в организме. Одним из перспективных направлений в противоопухолевой терапии сегодня является общая гипертермия (ОГ) [11]. Влияние ОГ на метаболизм может привести к преодолению лекарственной устойчивости и повышению иммуногенности опухоли, а также вызвать в опухоли апоптоз [12]. Поэтому представляется целесообразным провести исследование особенностей изменения выраженности окислительного стресса и апоптоза на этапах опухолевого роста при воздействии общей гипертермии.

Цель работы — изучить активность процессов перекисного окисления липидов и уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии общей гипертермии.

Материал и методы

В эксперименте использовали 28 крыс-самцов Вистар массой 180–200 г. Работу с животными проводили согласно директивам Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Использовали перевиваемый штамм опухоли Walker 256, поддерживаемый *in vivo* в лаборатории физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН. Суспензию клеток карциносаркомы Walker 256 вводили животным в мышцу бедра (10⁶ клеток в 0,1 мл изотонического раствора NaCl). Через 5 суток после перевивания опухоли животных разделили на две группы: контрольную (*n* = 7), со «спонтанным развитием опухоли», и опытную (*n* = 21), подвергнутую воздействию общей гипертермии (ОГ). Используемый способ моделирования ОГ у мелких лабораторных животных

[13] предполагает разогревание объекта исследования в резервуаре универсального водного термостата BWT-U, предназначенного для точного поддержания установленной температуры в диапазоне от 25 до 100 °С. Уровень ОГ, при котором прекращали разогрев животных, определялся ректальной температурой 43,5 °С (стадия теплового удара). Время разогревания каждого животного было индивидуальным, не зависело от исходной температуры тела, массы и составляло не более 17 мин.

Образцы сыворотки крови и опухолевой ткани для биохимического и иммуногистохимического исследований брали у животных контрольной группы на 5-е сутки после перевивания опухоли, у крыс опытной группы — через 7 и 14 суток после проведения ОГ.

Активность реакций ПОЛ оценивали по уровню реагирующих с тиобарбитуровой кислотой продуктов (ТБК-РП) в сыворотке крови с помощью спектрофотометрического метода при длине волны 532 нм [14]. Содержание жирорастворимых антиоксидантов (ретинола, α -токоферола) в сыворотке крови определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии [15] с использованием УФ детекции в диапазоне 260–292 нм.

Исследование уровня экспрессии белков семейства Bcl-2 выполняли на парафиновых срезах с помощью непрямого стрептавидин-авидинового метода [16]. Для выявления Bcl-2 и Bad в качестве первичных использовали мышиные моноклональные антитела (BD Biosciences) в разведении 1:100. Для выявления Bax применяли кроличьи поликлональные антитела к домену, играющему важную роль в образовании гомодимеров и гетеродимеров с антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 (BD Biosciences, США). Срезы докрашивали гематоксилином и эозином. О специфическом связывании антител с исследуемыми антигенами свидетельствовало выявляемое дисперсное мелкогранулярное окрашивание цитоплазмы клеток. Выявленность экспрессии антигенов в клетках опухолевой ткани анализировали по интенсивности иммуногистохимического окрашивания, оценку которого осуществляли с помощью программы Axio Vision 4.7.1 (Carl Zeiss, Германия) и блока автоматических измерений (Auto measure). В программу вычислений вводили значение процента площади позитивно окрашиваемых опухолевых элементов.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (*M*), ошибку среднего арифметического значения (*m*), и представляли в виде *M* ± *m*. Достоверность различий полученных значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, так как результаты предварительного анализа показали нормальное распределение данных в каждой группе экспериментальных животных [17], значимости различий средних величин оценивали для уровня достоверности 95 % (*p* < 0,05).

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ и жирорастворимых антиоксидантов в сыворотке крови у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии общей гипертермии ($M \pm m$)

Группа	Содержание ТБК-РП, нмоль/мл	Содержание токоферола, мг%	Содержание ретинола, мкг%
Контрольная	2,98 \pm 0,23	0,37 \pm 0,033	25,0 \pm 2,79
Опытная, 7-е сутки	7,74 \pm 1,02*	0,26 \pm 0,055*	31,2 \pm 3,70
Опытная, 14-е сутки	4,10 \pm 0,38*	0,23 \pm 0,014*	19,4 \pm 4,10*

Примечание: здесь и в табл. 2 звездочкой (*) обозначены значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от величин соответствующих показателей контрольной группы.

Результаты и обсуждение

Рассматривая динамику содержания продуктов ПОЛ и жирорастворимых антиоксидантов у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии ОГ, следует отметить (табл. 1), что уровень ТБК-РП в крови у них на 7-е и 14-е сутки эксперимента был в 2,6 и 1,4 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Противоположная картина наблюдалась для жирорастворимых антиоксидантов, концентрация которых в крови крыс с карциносаркомой Walker 256 после ОГ была меньше контрольных величин. Так, содержание токоферола на 7-е и 14-е сутки эксперимента было ниже в 1,6 и 1,4 раза, а концентрация ретинола на 14-е сутки уменьшилась в 1,3 раза ($p < 0,05$). Причем величина последнего показателя у крыс с карциносаркомой Walker 256 на 14-е сутки была достоверно меньше в 1,6 раза, чем на 7-е сутки ($p < 0,05$).

Следовательно, можно предположить, что у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии ОГ происходит смещение баланса про- и антиоксидантов в сторону усиления активности свободнорадикальных процессов, что является важным патогенетическим звеном развития окислительного стресса. Это в свою очередь может приводить к индукции апоптоза, в том числе в клетках опухолевой ткани.

При сравнительной оценке экспрессии белков семейства Bcl-2 (табл. 2) в контрольной группе (со спонтанным развитием опухоли) не было выявлено достоверных различий между содержанием Bcl-2 и Вах. В то же время уровень экспрессии Bad был

значимо выше, чем Bcl-2 и Вах, в 1,6 и 1,7 раза соответственно ($p < 0,05$). Известно, что один из механизмов апоптотической гибели клеток связан с изменением степени фосфорилирования/дефосфорилирования белка-индуктора Bad, поскольку при его дефосфорилировании образуются гетеродимеры Bcl-2/Bad и запускается апоптоз. Возможно, это является фактором, сдерживающим рост опухоли на ранних стадиях развития, так как установлено, что в молодых опухолях на ранних стадиях происходит активация апоптоза, но с увеличением массы опухоли активность гибели клеток резко падает и сохраняется на относительно стабильном уровне [18].

Дальнейший анализ результатов показал, что при воздействии ОГ возрастает уровень экспрессии промоторов апоптоза Вах и Bad (см. табл. 2). Обнаружено, что содержание Bad в опухолевой ткани у крыс с карциносаркомой Walker 256 на 7-е и на 14-е сутки эксперимента были значимо выше в 2,1 и 2,2 раза соответственно, чем у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Уровень белка Вах был также выше соответствующего показателя контроля на обоих сроках наблюдения (в большей степени на 7-е сутки) в 3,7 и 1,7 раза соответственно ($p < 0,05$). Высвобождение этих белков происходит при повышении проницаемости мембран митохондрий под контролем белков семейства Bcl-2/Bах, которые непрерывно взаимодействуют друг с другом, находясь в динамическом равновесии между гомо- и гетеродимерами [19]. Важно отметить, что уровень экспрессии Bcl-2 у крыс с карциносарко-

Таблица 2

Уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 в опухолевой ткани у крыс с карциносаркомой Walker 256 при воздействии общей гипертермии ($M \pm m$)

Группа	Bcl-2, %	Вах, %	Bad, %
Контрольная	19,9 \pm 1,52	19,1 \pm 2,05	32,6 \pm 1,81
Опытная, 7-е сутки	13,1 \pm 1,48*	71,5 \pm 4,49*	68,1 \pm 3,58*
Опытная, 14-е сутки	8,91 \pm 1,41*	33,5 \pm 1,59*	70,6 \pm 1,59*

мой Walker 256 на 7-е и на 14-е сутки после воздействия ОГ был достоверно ниже, чем в контроле, в 1,5 и 2,2 раза соответственно ($p < 0,05$).

Заключение

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют заключить, что при воздействии ОГ в организме крыс с карциносаркомой Walker 256 развивается окислительный стресс, индуцирующий программированную гибель клеток опухолевой ткани. Следовательно, одним из перспективных путей повышения эффективности противоопухолевой терапии может быть включение в комплексные лечебные мероприятия общей гипертермии, являющейся важным моментом в запуске апоптоза клеток злокачественной опухоли.

Список литературы

1. Carmody R.J., Cotter T.G. Signalling apoptosis a radical approach // *Redox Rep.* 2001. 6. 77–90.
2. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма // *Успехи соврем. биол.* 2001. 121 (5). 488–501.
Lyu B.N. Oxygen-peroxide concept of apoptosis and possible variants of its mechanism // *Uspekhi sovrem. biol.* 2001. 121 (5). 488–501.
3. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* 2001. 82. 47–95.
4. Gorman A., McGovan A., Cotter T.G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis // *FEBS Lett.* 1997. 404. 27–34.
5. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Бурлакова Е.Б. Влияние альфа-токоферола в широком спектре концентраций (10^{-2} – 10^{-17} М) на активность протеинкиназы С. Связь с пролиферацией и опухолевым ростом // *Биохимия.* 1994. 59 (2). 193–200.
Palmina N.P., Maltseva E.L., Kurnakova N.V., Burlakova E.B. Influence of an alpha-tocopherol in a wide spectrum of concentration (10^{-2} – 10^{-17} M) on activity of a protein kinase C. Relation to proliferation and tumor growth // *Biokhimiya.* 1994. 59 (2). 193–200.
6. Clement S., Tasinato A., Boscoboinik D., Azzi A. The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12-myristate 13-acetate down-regulation // *Eur. J. Biochem.* 1997. 246. 745–749.
7. Israel K., Yu W., Sanders B.G., Kline K. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis // *Nutr. Cancer.* 2000. 36. 90–100.
8. Weber T., Lu M., Andera L. et al. Vitamin E succinate is a potent novel anti-neoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) *in vivo* // *Clin. Cancer Res.* 2001. 8. 863–869.
9. Ionov Y., Yamamoto H., Krajewski S. et al. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97 (20). 10872–10877.
10. Choi J., Choi K., Benveniste E.N. et al. Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2 // *Cancer. Res.* 2005. 65 (13). 5554–5560.
11. Жаврид Э.А., Осинский С.П., Фрадкин С.З. Гипертермия и гипергликемия в онкологии. Киев: Наукова думка, 1997. 256 с.
Zhavrid E.A., Osinskij S.P., Fradkin S.Z. Hyperthermia and hyperglycemia in oncology. Kiev: Naukova dumka, 1997. 256 p.
12. Курпешов О.К., Цыб А.Ф., Мардынский Ю.С., Бердов Б.А. Механизмы развития и пути преодоления химиорезистентности опухолей // *Рос. онкол. журн.* 2003. 3. 50–53.
Kurpeshov O.K., Tsyb A.F., Mardynskij Yu.S., Berdov B.A. Development mechanisms and ways to overcome the tumors chemical resistance // *Ros. onkol. zhurn.* 2003. 3. 50–53.
13. Пат. 2165105 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / Ефремов А.В., Пахомова Ю.В., Пахомов Е.А. и др.; опубл. 12.10.2001.
Patent 2165105 RF. Method of experimental design of general hyperthermia in small laboratory animals / Efremov A.V., Pakhomova Yu.V., Pakhomov E.A. et al.; published 12.10.2001.
14. Waterfall A.H., Singh G., Fry J.R., Marsden C.A. The measurement of lipid peroxidation *in vivo* // *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* 1997. 2. 17–22.
15. Микичур Н.И., Сафронов И.Д. Микрометод определения различных форм токоферола для оценки компенсаторных и патологических состояний организма // *Проблемы оценки и прогнозирования функциональных состояний организма в прикладной физиологии.* Фрунзе, 1988. 238–240.
Mikichur N.I., Safronov I.D. Micromethod of determination of various forms of tocopherol to assess the organism compensatory and pathological states // *Problems of assessment and prognosis of organism functional states in applied physiology.* Frunze, 1988. 238–240.
16. Эллиниди В.Н., Аникиев Н.В., Максимов Н.А. Практическая иммуногистохимия: Метод. реком. СПб., 2002.
Ellinidi V.N., Anikeev N.V., Maksimov N.A. Practical immunohistochemistry: Method. recom. SPb., 2002.
17. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1999. 459 с.
Glants S. Medical biological statistics. M., 1999. 459 p.
18. Bowen I.D., Bowen S.M. Programmed cell death in tumours and tissues. London: Chapman and Hall, 1990.
19. Chinaiyn A.M. Molecular ordering of the cell death pathway — Bcl-2 and Bcl-X(L) function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases // *J. Biol. Chem.* 1996. 271. 4573–4576.

ACTIVITY INDICES OF PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION AND APOPTOSIS AT RATS WITH CARCINOSARCOMA WALKER 256 UNDER GENERAL HYPERTHERMIA

Elena Vladimirovna OVSYANKO¹, Igor Dmitrievich SAFRONOV^{1,2}, Yakhid Umerovna OVSYANKO¹

¹*Novosibirsk State Medical University of Roszdrav
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

²*Center of Clinical and Experimental Medicine SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The activity indices of processes of lipid peroxidation and apoptosis at rats with carcinosarcoma Walker 256 have been investigated under the influence of the general hyperthermia (43.5 °C). The received data testify, that the oxidative stress inducing tumor tissue cells apoptosis in rats with carcinosarcoma Walker 256 develops under the general hyperthermia. Which is confirmed by the increase in expression of Bax and Bad apoptosis promoters. Possible mechanisms of the initiation of malignant cells apoptosis under general hyperthermia have been discussed.

Key words: carcinosarcoma Walker 256, lipid peroxidation, antioxidants, apoptosis, general hyperthermia.

Ovsyanko E.V. — candidate of medical sciences, associated professor, e-mail: Vin_San92@mail.ru

Safronov I.D. — doctor of medical sciences, professor of the chair for pathophysiology and clinical pathophysiology

Ovsyanko Ya.U. — candidate of medical sciences, e-mail: Vin_San92@mail.ru