

УДК: 577.155.087: 616.006.04

ПОРІВНЯННЯ РІВНЯ ПРОДУКЦІЇ NO ТА ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ MCF-7 ЗА МОДИФІКАЦІЇ УМОВ МІКРООТОЧЕННЯ

О. М. ПЕРЕПЕЛИЦІНА¹, Л. В. ГАРМАНЧУК², Є. А. ШЕВЧЕНКО²,
М. В. СИДОРЕНКО¹, Л. І. ОСТАПЧЕНКО²

¹Відділення біотехнічних проблем діагностики Інституту проблем
кріобіології та кріомедицини НАН України, Київ;
e-mail: olenaquail@rambler.ru;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Досліджено зв'язок між рівнем генерації оксиду азоту в середовищі інкубації та проліферацією клітин на двох моделях культивування лінії раку молочної залози MCF-7: моношарі та сфероїдах. Умови мікрооточення модифікували за допомогою блокаторів кальцієвих каналів нітрендипіну, хлориду лантану та хелатору Ca^{2+} – ЕГТА. Було виявлено, що зменшення концентрації міжклітинного Ca^{2+} під впливом ЕГТА знижує рівень міжклітинного NO в середньому до 50% ($P \leq 0,05$) від контролю та призводить до збільшення кількості живих клітин на 10–40% ($P \leq 0,05$) порівняно з контролем. Нітрендипін виявляє властивості вибіркового блокатора Ca^{2+} -каналів L-типу, що призводить до зниження рівня міжклітинного NO на 35–70% ($P \leq 0,05$) залежно від концентрації речовини та часу інкубування. При цьому спостерігається підвищення проліферативного потенціалу пухлинних клітин на 10–35% ($P \leq 0,05$). Під впливом хлориду лантану в концентраціях 0,01 та 0,1 мМ, продукція NO в середовищі інкубації MCF-7 суттєво зменшується (на 50–60% від контролю), але кількість живих клітин у культурі істотно не змінюється. На моделях росту 2-D та 3-D виявлено, що концентрація міжклітинного NO на 1 млн. клітин складає в моношаровій культурі в середньому 3,2 пмоль, а в сфероїдній – 8,5 пмоль.

Ключові слова: оксид азоту, NO-синтаза, 2-D та 3-D моделі пухлинного росту, ЕГТА, нітрендипін, хлорид лантану.

Оксид азоту в організмі людини синтезується безперервно з L-аргініну під час реакції, котра каталізується NO-синтазою (NOS), у клітинах всіх органів [1], і регулює численні фізіологічні функції, бере участь у розвитку багатьох патологічних станів. Відомо, що оксид азоту має широкий спектр біологічної дії і характеризується поліфункціональністю проявів. Він здатний як посилювати процеси пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин і ліпопротеїнах сироватки крові, так і інгібувати їх, може спричинювати вазодилатацію та вазоконстрикцію, індукувати апоптозну загибель клітин або виявляти захисний ефект щодо апоптозу, спричиненого іншими агентами [1]. Протимікробний та цитотоксичний вплив оксиду азоту залежить від його концентрації у клітині та міжклітинному середовищі, а також концентрації продуктів його метаболізму: нітрит (NO_2^-) і нітрат-іонів (NO_3^-) [2], радикалів NO, пероксинітрит-іонів ($ONOO^-$) [1, 3, 4]. У фізіологічних умовах оксид азоту взаємодіє з O_2 , продукуючи діоксид азоту, який у водних розчинах утворює іони NO_2^-

й NO_3^- [5–7]. Різні органи, клітинні системи в різних фізіологічних станах характеризуються різним рівнем міжклітинного NO, що обумовлено динамічною рівновагою його метаболітів NO_2^- та NO_3^- . Збільшення кількості NO, за інших рівних умов у системі *in vitro*, призводить до збільшення концентрації нітритів та нітратів [1, 8]. Рівень активності NOS та концентрація NO, поряд з іншими параметрами, може свідчити про стан клітинної системи та бути прогностичним показником подальшого його розвитку.

Основним ферментом біосинтезу NO є NO-синтаза. Субстратом для синтезу оксиду азоту є L-аргінін, L-гомоаргінін, NG-метил-L-аргінін. Для функціонування NOS необхідна наявність таких кофакторів, як тіолзв'язуючий гем, FAD, FMN, 5,6,7,8-L-біоптерин, а також таких субстратів, як аргінін, кисень та NADPH [9]. Розрізняють конститутивну NOS (cNOS) та індукційну NOS (iNOS). Конститутивні NOS є менш потужними ферментами, ніж індукційні, їх поділяють на нейрональну (1-й тип) та ендотеліальну (3-й тип) ізофор-

ми. Конститутивні NOS – кальцій- і кальмодулінзалежні ензими [10, 11]. Найпотужнішою є кальційнезалежна індукбельна NOS, яка регулюється цитокінами. Активність цього ензиму визначається в різних культурах клітин і тканин. У разі активації синтезу ензиму швидкість утворення оксиду азоту зростає в десятки разів і досягає максимальних значень через кілька годин [8].

Більшість оксидних метаболічних шляхів локалізується в мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі, оскільки ці органели містять багато редокс-переносників і центрів, які створюють системи утилізації кисню та використовують його для генерування сигнальних молекул [12–14]. Вільний радикал оксиду азоту є відносно нестабільним в аеробних умовах. В мітохондріях радикальні форми NO з високим ступенем спорідненості взаємодіють із гемовими та негемовими протеїнами. NO конкурує за активні центри ензимів дихального ланцюга з киснем та утворює NO-Fe-S протеїни. Це призводить до втрати мітохондріями функціональної активності через пошкодження переносників електронів, що спричинює витікання електронів з утворенням супероксидних радикал-аніонів, вміст яких перевищує контрольні рівні в 2–3 рази. В таких умовах порушується ефективність функціонування мітохондріальної цитохромоксидази, що є поштовхом до розвитку клітинної гіпоксії та запуску механізму клітинного апоптозу. Підвищення рівня вільних радикалів – це також тригерний механізм запуску малігнізації клітин. З іншого боку, механізм порушення енергетичного обміну та синтезу ДНК використовується організмом для знищення пухлинних клітин макрофагами, котрі не тільки самі генерують NO, а ще й секретують фактор некрозу пухлин, який активує iNOS в пухлинних та клітинах, що їх оточують [1].

На органній культурі молочних залоз мишей було продемонстровано, що в епітеліальних клітинах присутні індукбельна та ендотеліальна NOS. Причому ензиматична активність була визначена не тільки в клітинах мікрокапілярів, а й в епітеліальних клітинах секреторних ділянок та у клітинах паренхіми [9]. Рівень NO та його метаболітів було визначено у внутрішній рідині кіст яєчників на різних стадіях пухлинної трансформації [15]. Після операційного втручання зразки внутрішньої рідини кіст відбирали за допомогою пункції, відмивали від клітинних елементів та використовували для визначення NO. Внаслідок цього було виявлено, що рівень NO

та його метаболітів у зразках малігнізованих пухлин (серозна цистаденокарцинома яєчника) складає 75,5 мкМ за підвищеної активності iNOS у 88,9% зразків; у зразках доброякісних новоутворень (серозна кіста яєчника) рівень NO досягав лише 38,5 мкМ при високій активності iNOS у 33% зразків. Таким чином, рівень міжклітинного NO має пряму кореляцію зі ступенем розвитку пухлинного процесу, причому суттєву роль у ньому відіграло саме порушення дихального ланцюга мітохондрій, виступаючи у ролі тригерного механізму вивільнення підвищеного рівня вільних радикалів [1, 3, 9, 16].

Тому метою нашої роботи було порівняльне дослідження рівня продукції NO в культуральне середовище та проліферації клітин раку молочної залози (лінії MCF-7) в умовах модифікації активності Ca²⁺-каналів за моношарового росту, а також порівняння рівня продукції NO клітинами моношарової та сфероїдної культури, яка є моделлю аваскулярної фази росту мікропухлин.

Матеріали і методи

Клітини раку молочної залози лінії MCF-7 люб'язно надані доктором І. Гутом (Людвіговський національний інститут раку, Лондон). Морфологія цих клітин епітеліоподібна, каріотип складає 2n=46, кількість поліплоїдів 0,6%, клітини є онкогенними у разі перещеплення безтимусним мишам [17]. Клітини MCF-7 культивувались у повному поживному середовищі DMEM, що містило 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 2 мМ L-глутаміну (всі реактиви Sigma, США) та 40 мкг/мл сульфату гентаміцину (Біофарма, Україна) у стандартних умовах при 37 °С, 5% CO₂, 100% вологості. Щільність культивування складала 2,0–4,0×10⁴ клітин/см² в моношарі (2-D культура). Культивування клітин MCF-7 у сфероїдах (3-D культура), які генерували з використанням 0,2% карбоксиметилцелюлози [17–19], проводили за таких самих умов. Щільність культивування становила 2,0–4,0×10⁴ клітин/мл.

Для визначення зв'язку між рівнем NO в міжклітинному середовищі та виживаністю клітин використовували модифікатори кальцієвих каналів: нітредипін як блокатор L-типу Ca²⁺-каналів та хлорид лантану – блокатор T-типу Ca²⁺-каналів. Хелатором кальцію було обрано етиленглікольтетраоцтову кислоту (ЕГТА). Речовини було внесено в культуральне середовище в кінцевих концентраціях 0,01; 0,1 та 1 мМ. Пухлинні клітини інкубували з від-

повідними речовинами протягом 10, 30, 60 хв. Контрольні виміри без додавання агентів проводили через 10, 30 та 60 хв інкубації так само, як і експериментальні. Визначення вмісту NO_2^- в реакції Гріса проводили за рекомендаціями виробника (Sigma, США). Для цього 50 мкл інкубаційного середовища відбирали у 96-лункову планшету. До зразків (3 паралелі) додавали по 50 мкл реактиву Гріса та інкубували протягом 5 хв з наступним вимірюванням рівня міжклітинного NO_2^- колориметричним методом, за довжини хвилі 540 нм на мультилунковому сканері Labsystems Multiskan MS (Фінляндія).

Кількість продукції NO_2^- зіставляли з калібрувальною кривою, котра будувалася для кожного зразка реактиву Гріса. Розрахунок концентрацій нітритів за цією кривою проводили за методом інтерполяції концентрації нітритів у зразку в діапазоні, визначеному за значенням оптичного поглинання та перерахунком концентрації міжклітинного NO_2^- у молях на 1 л середовища інкубації. Перерахування кількості NO у відповідності до визначеної кількості NO_2^- проводили згідно з хімічним рівнянням реакції [8].



Щоб прийняти до уваги вплив на загальний рівень продукції NO кількості клітин у різних культурах та зразках обчислювалася концентрація NO на 1 тис. клітин.

Для визначення впливу модуляторів Ca^{2+} -каналів на кількість живих клітин використовували МТТ-колориметричний тест [20], адаптований для визначення проліферації клітин, а також рутинний підрахунок клітин у камері Горяєва після забарвлення трипановим синім.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel. Вірогідність даних оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідними визнавали дані з $P \leq 0,05$ (*) та $P \leq 0,01$ (**).

Результати та обговорення

Першим етапом роботи було визначення зв'язку між генерацією міжклітинного NO та проліферативним потенціалом пухлинних клітин під впливом речовин, котрі модулюють активність cNOS. Оскільки строк життя NO_2^- складає 6–30 с [21], то в контрольних зразках спостерігається певний рівень балансу між продукцією NO та його розпадом. У контролі цей рівень складає 31,0 нМ та не змінюється.

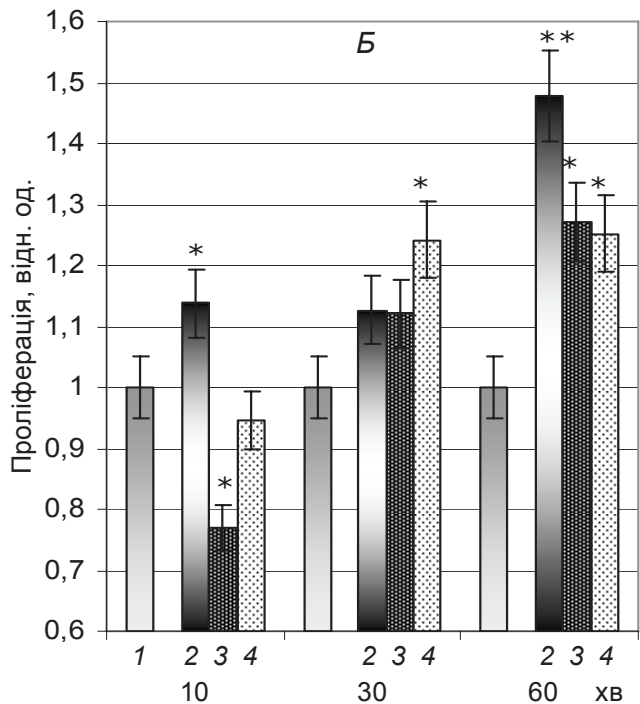
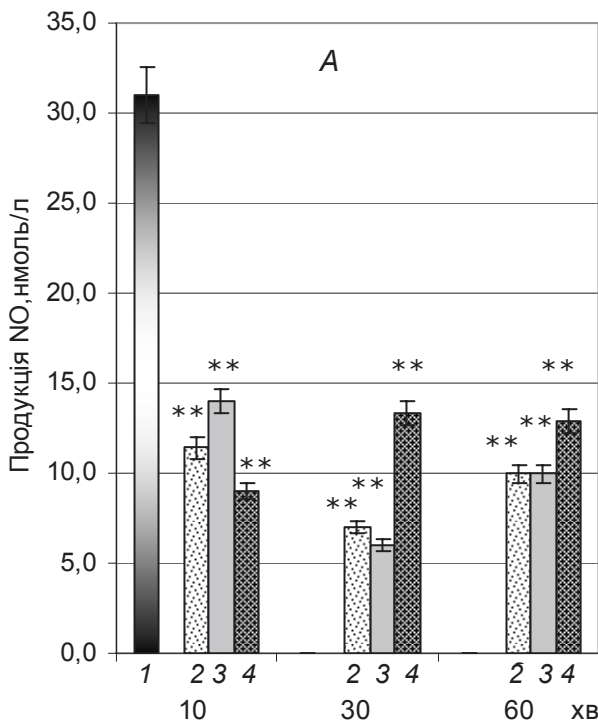


Рис. 1. Залежність продукції NO (А) та проліферації клітин MCF-7(Б) від концентрації (1 – контроль; 2 – 0,01 мМ; 3 – 0,1 мМ; 4 – 1 мМ) та часу інкубації з ЕГТА. Тут і на рис. 2, 3 ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

ся від 10 до 60 хв інкубації. Клітинний цикл MCF-7 – 72 год [22], тому протягом 10–60 хв інкубації в контролі без додавання модulators Ca²⁺-каналів кількість живих клітин статистично не відрізняється. Це дозволило вивести на рисунок один контрольний показник кількості NO та проліферації для всіх термінів інкубації клітин (10, 30 та 60 хв).

В експерименті використовувалася моношарова клітинна культура, до якої в середовище культивування вносили кальцієвий хелатор – ЕГТА. Тривалий вплив хелаторів Ca²⁺ здатен зменшувати концентрацію міжклітинного катіона, що, у свою чергу, призводить до зниження активності Ca-залежної cNOS. Ефект ЕГТА полягає у зменшенні біосинтезу оксиду азоту під впливом конститутивних, вже преекспресованих ензимних систем (мембранна або епігеномна фаза дії).

Наші дослідження показали, що рівень генерації NO при концентрації ЕГТА 0,01, 0,1 та 1 мМ знижується більш ніж на 50%. Показник має мінімальні значення для всіх концентрацій при 30 хв інкубації. У разі зміни часу інкубації рівень генерації NO тільки збільшується (рис. 1, А).

Одночасно, за дії ЕГТА спостерігається зниження рівня проліферації лише при кон-

центрації речовини 0,1 мМ та інкубації клітин з ЕГТА протягом 10 хв (рис. 1, Б, зразок 3, 10 хв). При інших концентраціях та подовженні строку інкубації до 30 та 60 хв рівень проліферації відновлюється (30 хв) та навіть достовірно підвищується (60 хв) (рис. 1, Б, 60 хв).

Припускається, що підвищення проліферації клітин MCF-7 за дії ЕГТА протягом 60 хв інкубації пов'язане з відновленням рівня інтрацелюлярного Ca²⁺ за рахунок кальцієвого депо клітини. При концентрації 0,01 мМ вплив ЕГТА супроводжується зменшенням кількості оксиду азоту на 39% до появи точки насичення (30 хв) та підвищення кількості живих клітин при 10 та 60 хв інкубації з хелатором. При концентрації 0,1 мМ вплив хелатору на кількість міжклітинного оксиду азоту є аналогічним: зменшення більш ніж у 2 рази під час всіх термінів інкубації, з переходом у точку насичення на 30-й хвилині (рис. 1, А). Проліферативний потенціал клітин, знижуючись на перших 10 хв інкубації (рис. 1, Б, зразок 3, 10 хв) потім відновлюється до контрольного рівня (рис. 1, Б, зразок 3, 30 хв) та навіть перевищує його на 27% (рис. 1, Б, зразок 3, 60 хв). Збільшення концентрації ЕГТА до 1 мМ (зразок 4), практично не впливає на продукцію NO. Таким чином, зміни у концентрації міжклітинного

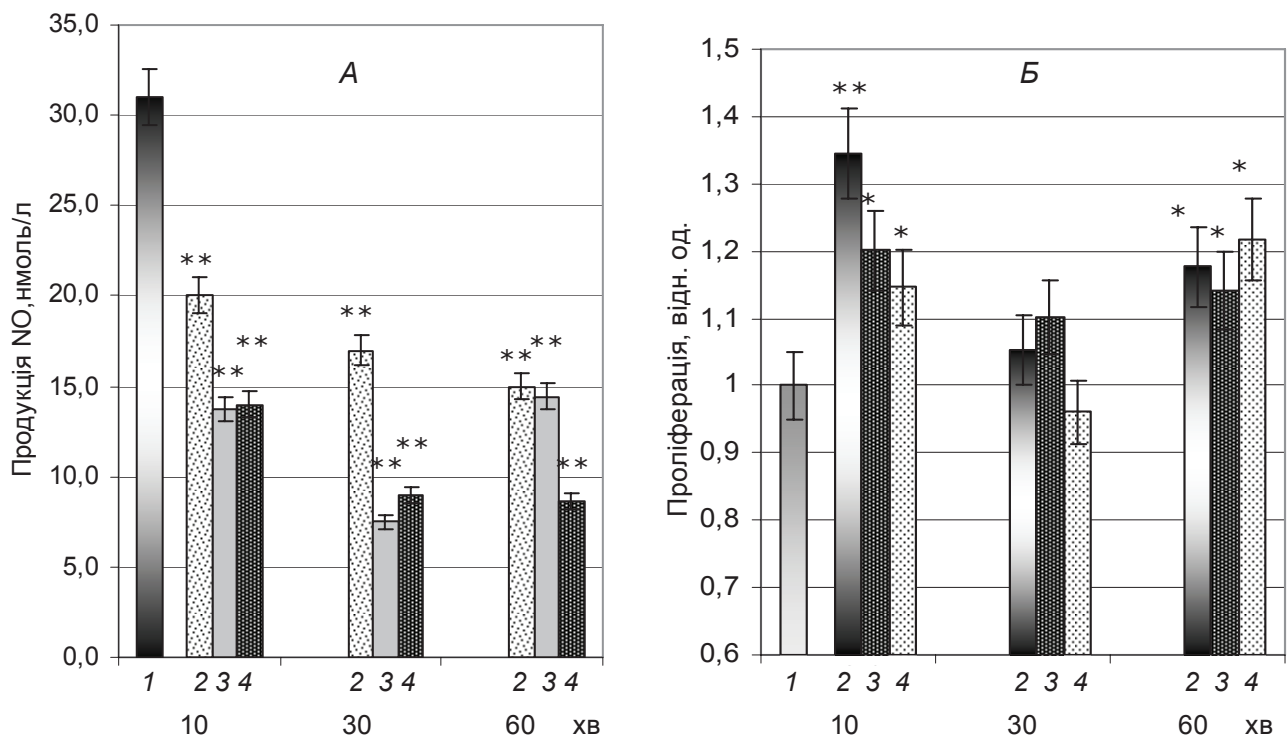


Рис. 2. Залежність продукції NO (А) та проліферації клітин MCF-7(Б) від концентрації (1 – контроль; 2 – 0,01 мМ; 3 – 0,1 мМ; 4– 1 мМ) та часу інкубації з нітрендіпіном

Ca²⁺ протягом 10 та 30 хв інкубування з ЕГТА не впливають суттєвим чином на проліферативний потенціал клітин, але при цьому відбувається зниження рівня міжклітинного NO на 70% порівняно з контролем. При 60 хв інкубації MCF-7 з ЕГТА, концентрація NO залишається низькою, а кількість живих клітин достовірно підвищується.

Під час інкубації пухлинних клітин із нітрендипіном протягом 10 хв було зафіксовано зменшення концентрації міжклітинного NO на 31–50% (рис. 2, А, 10 хв). Подовження часу дії нітрендипіну вірогідно знижує рівень продукції NO для всіх використаних концентрацій блокатора.

Загальний рівень проліферації клітин, при концентрації 0,01; 0,1 та 1 мМ нітрендипіну вірогідно вищий порівняно з контролем при малих строках інкубації (10 хв) клітин з агентом (рис. 2, Б, 10 хв). При збільшенні концентрації діючої речовини, інтенсивність проліферації клітин має зворотну тенденцію: при 0,01 мМ нітрендипіну проліферація клітин збільшується на 38%, при 0,1 мМ – на 20%, при 1 мМ – на 17% порівняно з контролем. Зменшення проліферації низки зразків при 0,01-0,1-1 мМ і при 10 хв інкубації є вірогідним лише для крайніх показників. Проліферація MCF-7 при інкубації з 0,1 мМ нітрендипіну

протягом 30 хв не відрізняється вірогідно від контролю (рис. 2, Б, 30 хв). При 60 хв інкубування проліферативний потенціал перевищує контрольні показники (рис. 2, Б, 60 хв).

Таким чином, нітрендипін у клітинах аденокарциноми виявляє себе як селективний інгібітор активності NOS, що супроводжується підвищенням проліферативного потенціалу пухлинних клітин. Відмічено про-проліферативну дію нітрендипіну на клітини протягом 10 та 60 хв інкубації при всіх трьох концентраціях агента. Встановлений ефект може бути пов'язаний зі здатністю нітрендипіну блокувати L-тип Ca²⁺-каналів та зменшувати активність кальційзалежної cNOS. Менший вплив нітрендипіну на рівень NO порівняно з ЕГТА пояснюється тим, що в мембрані клітин епітеліального походження присутність каналів L-типу знижена, а кальційзалежна cNOS не є домінуючою [12, 13]. До того ж нітрендипін є також донором оксиду азоту (похідне 1,4 – дигідропіридину).

Для порівняння використовували блокатор T-типу Ca²⁺-каналів – хлорид лантану (рис. 3, А). У концентраціях 0,01; 0,1 та 1 мМ, при часі інкубації 30 хв, хлорид лантану призводить до максимального зменшення кількості міжклітинного оксиду азоту на 36, 38 та 48% відповідно порівняно з контролем

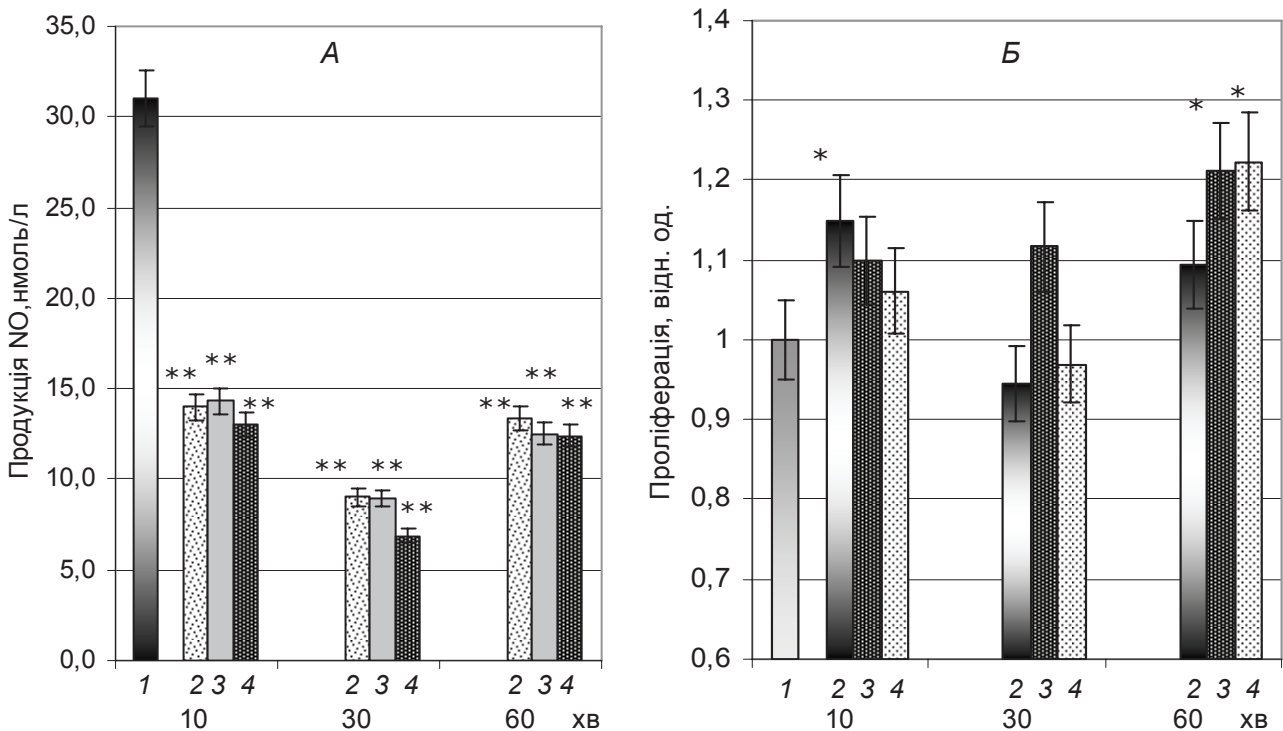


Рис. 3. Залежність продукції NO (А) та проліферації клітин MCF-7 (Б) від концентрації (1 – контроль; 2 – 0,01 мМ; 3 – 0,1 мМ; 4 – 1 мМ) та часу інкубації з хлоридом лантану

(рис. 3, А, 30 хв). В цих умовах, хлорид лантану не призводить до вірогідної зміни кількості живих клітин (рис. 3, Б, 30 хв). Подовження терміну інкубації клітин із хлоридом лантану супроводжується зменшенням рівня цитостатичного впливу цієї речовини можливо за рахунок відновлення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} ; при 60 хв інкубації проліферативний потенціал клітинної популяції відновлюється (рис. 3, Б, 60 хв). Хлорид лантану, можливо, вибірково взаємодіє з Т-типом каналів, які присутні в мембрані епітеліальних клітин у більшій кількості, ніж канали L-типу, та інгібує активність cNOS. Відновлення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} призводить до нормалізації клітинного циклу і збільшення кількості живих клітин.

Дослідження на клітинах MCF-7 продемонструвало, що інгібуюча дія хлориду лантану на продукцію міжклітинного NO вираженіша порівняно з нітрендипіном та менш виражена порівняно з ЕГТА. Продукція оксиду азоту клітинами аденокарциноми молочної залози під впливом Ca^{2+} -хелатору ЕГТА та хлориду лантану – блокатора Т-типу Ca^{2+} -каналів (основний тип у клітинах MCF-7) в концентраціях 0,01 та 0,1 мМ зменшується, що може бути обумовлено зниженням рівня цитозольного Ca^{2+} і пригніченням Ca^{2+} -залежної cNOS. Мінімальна продукція NO спостерігається при 30 хв інкубації зі всіма агентами. Подальше відновлення рівня продукції оксиду азоту може бути пов'язане з підвищенням ензиматичної активності cNOS завдяки компенсаторному вивільненню Ca^{2+} із внутрішньоклітинного кальцієвого депо [1]. Загальне зниження рівня продукції NO супроводжується збільшенням кількості живих клітин. При цьому фіксуються різні рівні проліферації: для ЕГТА – підвищення проліферації після 30 та 60 хв інкубації клітин з агентом; для нітрендипіну – підвищення проліферації після 10 хв інкубації з подальшим зниженням до контрольного рівня; а для хлориду лантану спостерігається підвищення проліферації вище контрольного рівня лише в чотирьох зразках із дев'яти. Це, можливо, пов'язано з різними механізмами дії зазначених речовин. Одержані дані зафіксовані для моношарової клітинної культури, котра є віддаленою моделлю пухлинного росту. Тому для порівняння рівня продукції міжклітинного NO, як можливого чинника прогресії пухлинних клітин, використовували модель багатоклітинних сфероїдів, що відображає аваскулярну фазу росту пухлинного мікроузла.

У попередніх дослідах на моделях моношарового та сфероїдного росту клітин MCF-7 нами було виявлено значну різницю у проліферації, виживаності та реактивності клітин [17, 18]. Структура гетерогенної клітинної популяції сфероїда є концентричною з проліферуючими клітинами по периферії, середньою зоною зі сплячими клітинами та некротичним ядром, що відповідає морфології солідної пухлини. Низка дослідів [23–25] показала, що утворення некрозу всередині пухлини є наслідком ряду факторів (гіпоксія, нестача поживних речовин, низький рівень рН, накопичення продуктів життєдіяльності клітин). За допомогою сфероїдів вивчаються молекулярні механізми, які впливають на індукцію клітинної загибелі [25, 26].

Для проведення дослідження однакову кількість клітин було посіяно в поживне середовище. Культивування проводили протягом 24 год. Результати вимірювання кількості живих клітин та концентрації міжклітинного оксиду азоту представлено на рис. 4, А, Б.

Встановлено, що при кількості живих клітин у моношарі $2,6 \times 10^6$ кл/мл концентрація міжклітинного NO складає лише 8,46 нмоль/л, в той самий час, у сфероїдній культурі $2,1 \times 10^6$ кл/мл генерують 17,8 нмоль/л NO. Таким чином, кількість оксиду азоту на 1 млн. клітин складає в моношаровій культурі в середньому 3,2 пмоль, а в сфероїдній – 8,5 пмоль.

Встановлена істотна різниця в показниках може бути пов'язана з морфологічними відмінностями моношарової та сфероїдної культури [18, 23–25]. У моношаровій культурі клітини мають рівний доступ до поживних речовин, адгезивної поверхні та кисню і саме тому внутрішньоклітинні процеси не мають зовнішніх обмежень для клітин культури. Водночас мікроагрегати розмірами більше 50 клітин вже починають розшаровуватися на зовнішній шар, котрий має доступ до поживних речовин і кисню та вищий проліферативний потенціал, і внутрішній шар, який знаходиться у стані гіпоксії та зниженого споживання. В таких умовах частина клітин входить у стан спокою, а інша частина утворює некротичну зону. Крім того важливим є той факт, що для діяльності NOS необхідна достатня кількість кисню [23]. Таким чином, можна передбачити, що середня кількість оксиду азоту на одну клітину сфероїдів (зовнішнього шару) є ще вищою, ніж визначено в експерименті, оскільки тільки половина клітин може активно генерувати NO

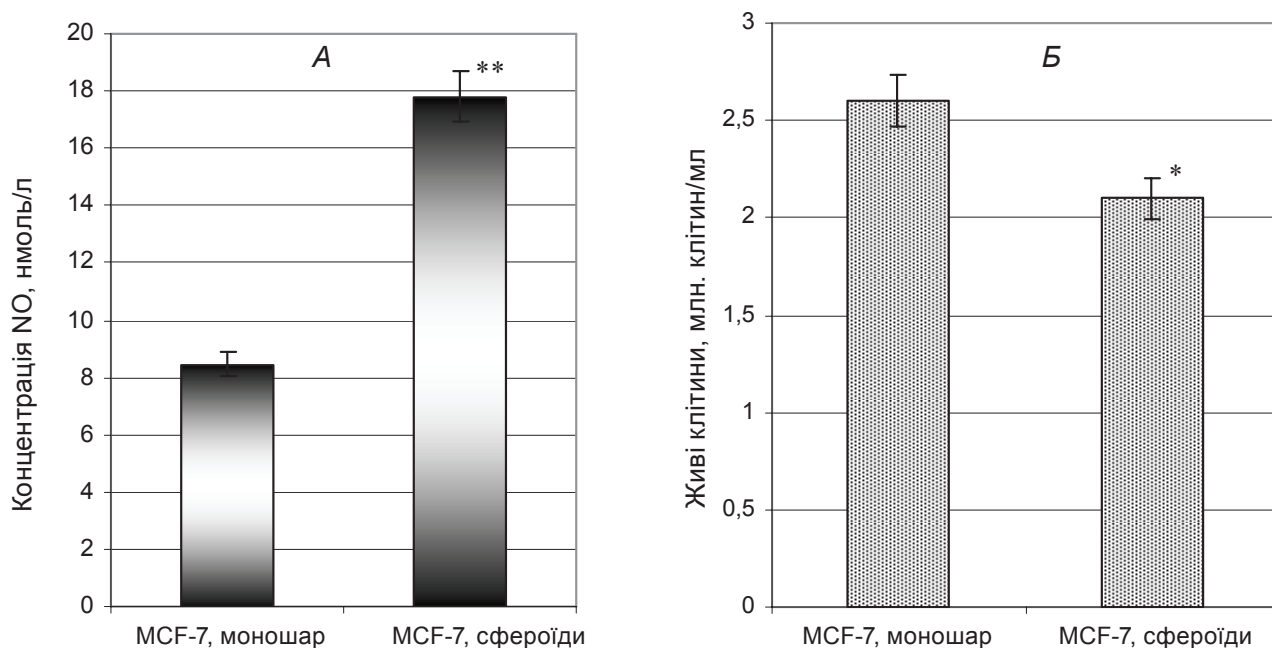


Рис. 4. Концентрація міжклітинного оксиду азоту в моношарі та сфероїдах (А), кількість живих клітин у моношарі та сфероїдах (Б). ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$ порівняно з моношаром

[26]. Саме ці клітини мають високий проліфераційний та метастатичний потенціал [25], підвищений рівень активності NOS та здатні до аутоіндукції NOS. Тобто клітини з високим клоногенним потенціалом здатні існувати та проліферувати у разі підвищеного рівня NO, що у свою чергу може спричинити утворення вільних радикалів та незворотні порушення у генетичному матеріалі та структурах клітин мікрооточення. Досліди на тваринах підтвердили цю гіпотезу, продемонструвавши підвищену швидкість росту, васкуляризації та інвазії пухлин, клітини яких продукують підвищений рівень NO [16].

Таким чином, на підставі одержаних результатів можна зазначити, що визначення рівня міжклітинного NO, поряд з іншими показниками, може бути як діагностичним критерієм, котрий фіксує ступінь малігнізації клітинної популяції, так і прогностичним, демонструючи можливі ризики для ескалації пухлинного процесу.

СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ NO И ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7 ПРИ МОДИФИКАЦИИ УСЛОВИЙ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Е. М. Перепелицына¹, Л. В. Гарманчук²,
Е. А. Шевченко², М. В. Сидоренко¹,
Л. И. Остапченко²

¹Отделение биотехнических проблем диагностики Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Киев;
e-mail: olenaquail@ Rambler.ru;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина

Была исследована связь между уровнем генерации оксида азота и пролиферацией клеток на двух моделях культивирования клеток рака молочной железы линии MCF-7: в монослое и сфероидах. Условия микроокружения модифицировались с помощью блокаторов кальциевых каналов нитрендипина, ЭГТА и хлорида лантана. Было установлено, что снижение кон-

центрации внеклеточного Ca^{2+} под действием ЭГТА, снижает уровень межклеточного NO в среднем до 50% ($P \leq 0,05$) от контроля и приводит к увеличению числа живых клеток на 10–40% ($P \leq 0,05$) от контроля. Нитрендипин проявлял себя как избирательный блокатор Ca^{2+} -каналов, что сопровождается снижением уровня межклеточного NO на 35–70% ($P \leq 0,05$) в зависимости от концентрации вещества и срока инкубирования. При этом наблюдается увеличение пролиферационного потенциала опухолевых клеток на 10–35% ($P \leq 0,05$). Продукция оксида азота в клетках MCF-7 под влиянием хлорида лантана в концентрациях 0,01 и 0,1 мМ характеризуется существенным снижением (на 50–60% от контроля), но не оказывает влияния на количество живых клеток в культуре. На моделях 2-D и 3-D клеточного роста выявлено, что концентрация межклеточного оксида азота на 1 млн. клеток составляет в монослойной культуре в среднем 3,2 пмоль, а в сфероидной – 8,5 пмоль.

Ключевые слова: оксид азота, NO-синтаза, 2-D и 3-D модели опухолевого роста, блокаторы кальциевых каналов.

COMPARISON OF NO PRODUCTION LEVEL AND BREAST ADENOCARCINOMA CELLS MCF-7 PROLIFERATION UNDER MODIFICATION CONDITION OF MICROENVIRONMENT

O. M. Perepelytsina¹, L. V. Garmanchouk², E. A. Shevchenko², M. V. Sydorenko¹, L. I. Ostapchenko²

¹Department of Biotechnical Problems of Diagnostic Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: olenaquail@rambler.ru;

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine

Summary

Connection between the level of NO generation and its cytotoxic influence was investigated on two models of tumor cells (breast adenocarcinoma MCF-7) culture: monolayer and spheroids. Conditions of microenvironment were modified by Ca^{2+} channels blockers: EGTA, nitrendipine and Cl-lanthan. It was discovered in the work that deviation in concentration of extracellular Ca^{2+} under the influence of EGTA leads to reducing of the level of extracellular NO to 50% ($P \leq 0.05$) of control and increasing of the number of live cells by

10–40% ($P \leq 0.05$). Nitrendipin has the properties selective Ca^{2+} channels blocker that reduced the level of NO by 35–70% ($P \leq 0.05$), depending on the substances concentration and time of incubation. At that time proliferation potential of cells increased by 10–35% ($P \leq 0.05$). NO production in MCF-7 cells under the influence of Cl-lanthan in concentration of 0.01 and 0.1 mM is reduced by 50–60%, as compared with the control. But it had no influence on the number of live cells. On 2-D and 3-D models of tumor growth it was demonstrated that extracellular NO production in monolayer of MCF-7 was 3.2 pmol for 10^6 cells and for spheroids it was 8.5 pmol.

Key words: nitrogen oxide, NO-synthase, 2-D and 3-D models of tumor growth, Ca^{2+} channels blockers.

1. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н. С. / Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 165 с.
2. Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – **89**, N 7. – P. 3030–3034.
3. Nomelini R., Ribeiro L., Tavares-Murta B. et al. // Mediators Inflamm. – 2008. – N 10. – P. 1–7.
4. Adad S., Fernando E., Murta C. et al. // Am. J. Pathol. – 2003. – **162**, N 3. – P. 793–801.
5. Fang P. C. // J. Clin. Invest. – 1997. – **99**, N 12. – P. 2818–2825.
6. Klebanoff S. J. // J. Leukoc. Biol. – 2005. – **77**, N 1. – P. 529–557.
7. Halliwell B., Gutteridge J. M., Cross C. E. // J. Lab. Clin. Med. – 1992. – **119**, N 6. – P. 598–620.
8. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. / Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. – М. ГЕОТАР Медиа, 2001. – 177 с.
9. Makoto Onoda, Hiroshi Inano // J. Histochem. Cytochem. – 1998. – **46**, N 11. – P. 1269–1278.
10. Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. // Nature. – 1987. – **327**, N 6122. – P. 524–526.
11. Palmer R. M., Ashton D. S., Moncada S. // Ibid. – 1988. – **333**, N 6174. – P. 664–666.
12. Thannickal V. J. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2003. – **284**, N 1. – P. 24–25.
13. Fridovich I. // Annu. Rev. Biochem. – 1995. – **64**. – P. 97–112.
14. Cadenas E., Davies K. J. // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – **29**, N 3–4. – P. 222–230.
15. Anttila M. A., Voutilainen K., Merivalo S. et al. // Gynecol. Oncol. – 2007. – **105**, N 1. – P. 97–103.

16. *Jenkins D. C., Charles I. G., Thomsen L. L. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – **92**, N 10. – P. 4392–4396.
17. *Garmanchouk L. V., Perepelytsina O. M., Sidorenko M. V., Ostapchenko L. I.* // Cytol. Genet. – 2009. – **43**, N 5. – P. 305–310.
18. *Perepelytsina O. M., Garmanchouk L. V., Sidorenko M. V., Ostapchenko L. I.* // Ph. Alive. – 2008. – **16**, N 2. – P. 105–111.
19. *Перепелиціна О. М., Гарманчук Л. В., Сидоренко М. В.* // Буков. мед. вісник. – 2007. – **11**, № 3. – С. 125–128.
20. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. – 1983. – **65**, N 1–2. – P. 55–63.
21. *Marsh N., Marsh A.* // Clin. Exp. Pharmacolol. Phisiol. – 2000. – **27**, N 4. – P. 313–319.
22. *Canfeza Sezgin, Ulus Ali Şanlı, Rüçhan Uslu, Erdem Göker* // Turk. J. Med. Sci. – 2002. – **32**, N 6. – P. 439–444.
23. *Waleh N. S., Brody M. D., Knapp M. A. et al.* // Cancer Res. – 1995. – **55**, N 24. – P. 6222–6226.
24. *Muller-Klieser W.* // AJP-Cell Physiology. – 1997. – **273**, N 4. – P. 1109–C1123.
25. *Stuschke M., Budach V., Stuben G. et al.* // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1995 – **32**, N 2. – P. 395–408.
26. *Rolf Bjerkvig* / Spheroid culture in cancer research. – CRC Press. – 1992. – P. 335.

Отримано 01.02.2010