

Изучение апоптоз-индуцирующей активности природных полифенолов с помощью ядерного магнитного резонанса

В.М. Михайленко, А.А. Фильченков, М.П. Завелевич

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого Национальной академии наук Украины, Киев*

Разработка новых эффективных препаратов на основе субстанций природного происхождения, обладающих комплексным действием, является актуальной задачей современной науки. В последнее время особое внимание исследователей привлекают полифенолы, содержащиеся в растениях. Механизм их терапевтического действия связывают, в первую очередь, со способностью инактивировать гидроксильные и супероксидные кислородные радикалы, хелатировать металлы переменной валентности (медь, железо) катализирующие свободнорадикальные процессы, а также блокировать липоксигеназу, что способствует ингибированию синтеза лейкотриенов. В последнее время было также показано, что некоторые из полифенолов являются индукторами апоптоза в злокачественных клетках различного происхождения. Поэтому, представляет несомненный интерес как изучение механизмов апоптоз-индуцирующего действия полифенолов, так и скрининг этих соединений как индукторов апоптоза опухолевых клеток.

Существует несколько различных методов идентификации и оценки содержания апоптотических клеток (АК). Они основаны на оценке различных морфологических и биохимических изменений в процессе реализации апоптоза. Это: 1) активация ферментов, участвующих в процессах апоптоза (каспазы, специфические ДНК-азы, протеинкиназы, протеинфосфатазы); 2) уменьшение размеров и увеличение плотности клеток; 3) изменения состава наружной мембраны клеток; 4) избирательная фрагментация ядерной ДНК; 5) снижение рН цитоплазмы [1].

Для количественного анализа изменений состава цитоплазматической мембраны предложено использовать метод протонного (^1H) ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), который позволяет регистрировать изменения интенсивности сигналов метиленового (CH_2 при 1,3 м.д.) и метильного (CH_3 при 0,9 м.д.) резонансов [2]. Природа этих резонансов связана с особенностями обмена липидов в клетке, а также изменениями состава и текучести клеточной мембраны [3]. Учитывая физические особенности метода ЯМР, сигналы CH_2 - и CH_3 -резонансов регистрируются от протонов входящих в состав мобильных липидных доменов (МЛД) с молекулами обладающими достаточной молекулярной подвижностью. Ранее нами были проанализированы изменения содержания МЛД в перевиваемых линиях злокачественных лимфоидных клеток человека, вызываемые химиопрепаратами с различным механизмом действия, и была подтверждена их специфичность для апоптотической гибели клеток [4].

Целью настоящих исследований было проведение качественной и количественной оценки содержания МЛД в злокачественных лимфоидных клетках при действии природных полифенолов кверцетина и ресвератрола, а также сопоставление эффективности метода ЯМР с другими методами распознавания АК.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальной модели использовали суспензионную культуру злокачественных лимфоидных клеток человека (линия Namalwa). Клетки обрабатывали в логарифмической фазе роста флавоноидом кверцетином (30 мкмоль/л, 48 час или 1,5 мес) или фитоалексином ресвератролом (40 мкмоль/л, 48 час). В качестве препарата сравнения использовали этопозид (10 мкмоль/л, 18 час). Образцы клеток промывали, суспендировали в 0,6 мл PBS-D₂O и помещали на лед перед проведением ЯМР-анализа.

Спектры протонного магнитного резонанса регистрировали на ЯМР-спектрометре Varian Mercury BB (Varian, США) с рабочей частотой 300 МГц при температуре 4°C. Регистрацию спектра проводили с использованием 90° импульса с релаксационной задержкой 10 сек путем суммирования 128-512 сигналов спада свободной индукции при 32 К до достижения отношения сигнал/шум больше 150. В качестве стандарта использовали стеклянный капилляр с 0,1% раствором ТСП (триметилсиалопропионовая кислота) в дейтерированной воде сигнал которого соответствовал 0,0 м.д. Стандартизованные области резонансов CH₃- и CH₂-протонов МЛД интегрировали с использованием компьютерной программы VNMR (Varian, США). Для определения уровня МЛД в клетках рассчитывали соотношение интегральных величин метиленового и метилового (CH₂/CH₃) сигналов. Поскольку интенсивность сигнала CH₃-протонов практически не изменяется при апоптозе, она может быть использована в качестве внутреннего стандарта при оценке относительных уровней МЛД в разных экспериментах.

Образцы клеток одновременно анализировали с помощью светового микроскопа и проточного цитофлуориметра (выявление гиподиплоидных клеток после окраски пропидиум йодидом).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что культивирование клеток линии Namalwa на протяжении 2 суток в присутствии исследуемых полифенолов в указанных концентрациях замедляло скорость роста клеток. При этом индукция апоптоза по данным проточной цитофлуориметрии не превышала 10% по сравнению с контрольным уровнем.

Для регистрации ранних апоптотических изменений, вызываемых кверцетином и ресвератролом, использовали метод протонной ЯМР-спектроскопии. Типичный ¹H-ЯМР-спектр клеток линии Namalwa с характерными сигналами протонов входящих в состав МЛД приведен на рис.

1. По полученным спектрам рассчитывали соотношение сигналов протонов CH_2/CH_3 групп и интенсивность сигнала холина (рис. 2).

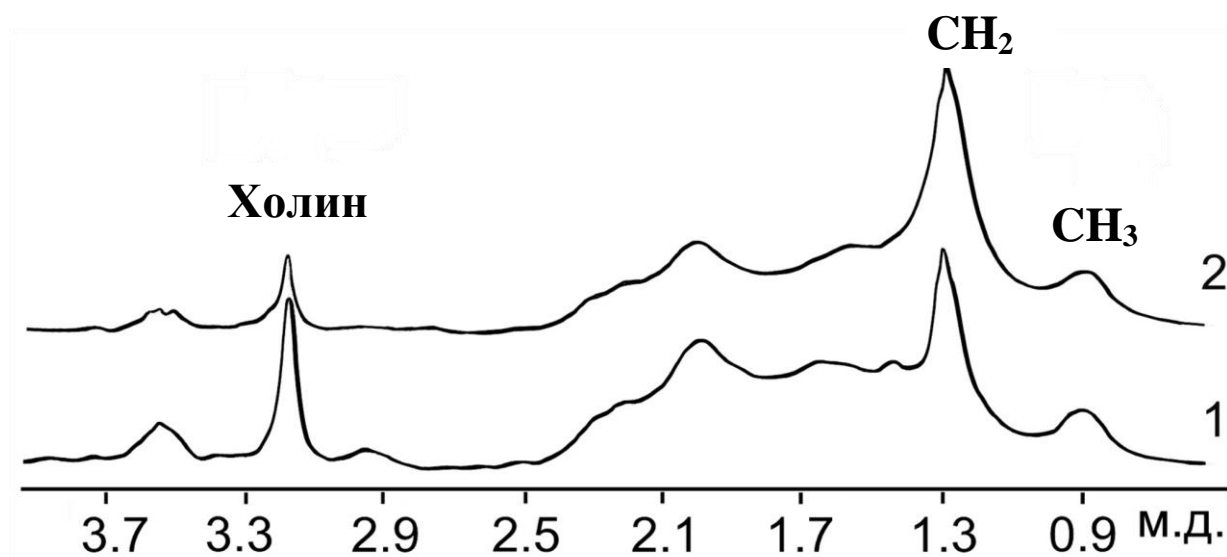


Рис. 1. Типичный ^1H -ЯМР спектр суспензии клеток Namalwa.

1 – контрольные клетки; 2 – клетки после действия препаратов

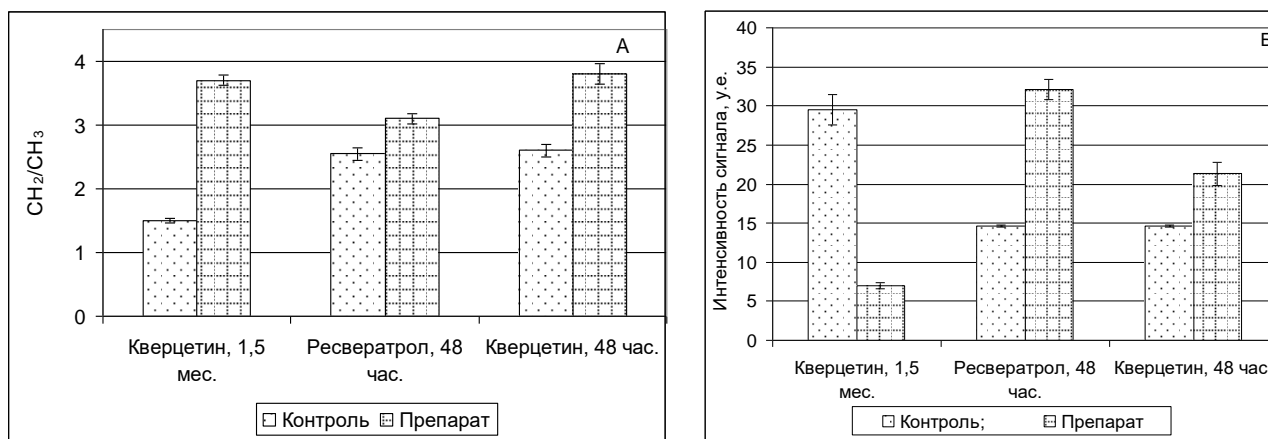


Рис. 2. Влияние природных полифенолов кверцетина и ресвератрола на интенсивность сигналов ^1H -ЯМР в клетках Namalwa. А – соотношение CH_2/CH_3 ; Б – интенсивность сигнала холина

Показано, что соотношение CH_2/CH_3 при действии кверцетина и ресвератрола на протяжении 48 часов увеличилось до 3,8 и 3,1, соответственно, что свидетельствует о формировании апоптоз-ассоциированных МЛД в этих клетках. Соотношение CH_2/CH_3 в контрольных

клетках за тот же период культивирования возросло до 2,6, что связано с появлением некоторого количества апоптотических клеток в культуре, вступившей в стационарную фазу роста. В контрольных клетках находящихся в логарифмической фазе роста соотношение составляло 1,5.

Длительное действие кверцетина на протяжении 45 суток не изменяло доли апоптотических клеток на каждом пассаже. Между тем, даже в логарифмической фазе роста клеток содержание апоптоз-ассоциированных МЛД при постоянном присутствии кверцетина не отличалось от такового в стационарной фазе при кратковременном воздействии этого препарата.

Интенсивность сигнала холина, существенно снижалась при длительном культивировании клеток в присутствии кверцетина, тогда как при кратковременном воздействии исследуемых полифенолов уровень холина увеличивался. По-видимому, данный показатель не отражает уровня апоптотических изменений в исследуемой модели.

Сравнение результатов ^1H -ЯМР с данными проточной цитофлуориметрии клеток, обработанных этопозидом, показало, что уровень МЛД в клетках (определяемый по соотношению CH_2/CH_3) после индукции в них апоптоза коррелирует ($R = 0,992$) с содержанием апоптотических клеток, определяемому общепринятыми методиками.

Таким образом, методом ЯМР зарегистрированы апоптоз-ассоциированные изменения уровня МЛД в клетках лимфомы Беркитта при действии кверцетина и ресвератрола в нетоксических концентрациях, что свидетельствует о возможности применения этих препаратов в качестве модификаторов апоптоза.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Н.Н. Храновской за помощь в проведении цитофлуориметрических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фильченков А. А.* Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии. К., 2003 (http://www.onconet.kiev.ua/publ/philchenkov_2_ru.html).
2. *Blankenberg F.G., Katsikis P.D., Storrs R.W. et al.* Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Blood*. 1997. Vol. 89, N 10. P. 3778-3785.
3. *Hakumaki J.M., Brindle K.M.* Techniques: Visualizing apoptosis using nuclear magnetic resonance // *Trends Pharmacol. Sci.* 2003. Vol. 24, No. 3. P. 146-149.
4. *Mikhailenko V.M., Philchenkov A.A., Zavelevich M.P.* Analysis of ¹H-NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication // *Cell Biology Int.* 2005. Vol. 29, N. 1. P. 33-39.