

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ-МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

И.А. Данилин¹, Б.И. Сынзыныс², О.А. Сморызанова³

¹Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,
Подольское ш., 8/5, 113093, Москва, Россия

²Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск, Россия

³Экологический факультет, Государственный технический университет атом-
ной энергетики, Студгородок-1, Обнинск, Россия

В данной работе исследовалась роль белков-МТ при развитии опухолевого процесса у мышей. Для этого определяли удельное содержание МТ в клетках растущей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), а также в клетках печени и костного мозга. Показано, что рост опухоли вызывает снижение количества клеток костного мозга у мышей-опухоленосителей. Введение $CdCl_2$ приводит к восстановлению клеточности до уровня контроля, при этом введение $CdCl_2$ мышам-опухоленосителям увеличивает содержание белков-металлотионеинов (МТ) в клетках костного мозга и печени.

Металлотионеины (МТ) представляют собой низкомолекулярные белки (6-7 кДа), содержащие до 30% цистеина и способные связывать ионы тяжелых металлов. МТ обнаружены во всех исследованных эукариотических организмах, а также в клетках прокариот [1]. В настоящее время увеличение уровня МТ – рассматриваются как одна из форм адаптивного ответа, приводящего к увеличению радиорезистентности биологических объектов [2].

Существуют противоречивые данные по корреляции между повышенным уровнем МТ и выживаемостью. Механизм антиоксидантного действия МТ не получил однозначного трактования [2-4].

Материалы и методы

Реактивы: $CdCl_2$ (хч, "Chem-Gliwi", Польша); HCl (ч, "ХРК", Россия); трис ("Serva", Германия); $CdCl_2$ (удельная активность 7,4 ГБк/мг, "Циклотрон", Россия).

Животные, их содержание: Эксперименты выполнены на мышах (СВА×С57В1/6) массой 22-24 г. В каждом из опытов использовали либо только самцов, либо самок. Мышей каждой группы отдельного опыта содержали в отдельных клетках, в одинаковых условиях и при одинаковом рационе. По окончании опыта мышей забивали и извлекали печень, которую хранили при температуре $-40^{\circ}C$.

Перевивка и определение роста опухолей у мышей-опухоленосителей: Для перевивки асцитного варианта опухоли Эрлиха опухолевые клетки вводили животным в виде асцитной жидкости, для чего 8-9-дневного роста асцит в объеме 0,2 мл, содержащий $(1,5 \pm 2,5) \times 10^7$ клеток, вводили в брюшную полость каждому животному.

Оценку опухолевого роста асцитной опухоли проводили по общему количеству опухолевых клеток. Для этого асцитную жидкость отсасывали шприцем, затем брюшную полость дважды промывали 10 мл 0,15 М раствора NaCl

и проводили подсчет клеток в камере Горяева с последующим пересчетом на весь объем жидкости.

Выделение и пробоподготовка опухолевых клеток для определения МТ: Асцитическую жидкость с содержащимися в ней опухолевыми клетками, выделенную из брюшной полости мышей-опухоленосителей, центрифугировали в течение 10 мин. при 3000 оборотов/мин (ОПН-8). Оставшиеся в виде осадка опухолевые клетки промывали физиологическим раствором 2 раза; к осадку добавляли 1мл физиологического раствора и центрифугировали 10 мин. при 3000 оборотов/мин. (ОПН-8). После удаления супернатанта к осадку добавляли 1 мл физиологического раствора, размешивали и центрифугировали 10 мин. при 3000 оборотов/мин. (ОПН-8).

К осадку, содержащему опухолевые клетки, добавляли 0,5 мл 1% раствора тритона в 0,01М трис-НСI буфере рН=8,2, прогревали на водяной бане 3 мин. и центрифугировали 10 мин. при 3000 оборотов/мин. (ОПН-8).

Выделение клеток костного мозга мышей и пробоподготовка для определения МТ: Клетки костного мозга выделяли из бедренной кости мыши, промывая содержимое кости 1 мл физиологического раствора. Затем проводили подсчет клеток в камере Горяева.

Пробоподготовка клеток костного мозга для определения МТ проводится по аналогичной схеме, описанной для опухолевых клеток.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные об увеличении числа клеток опухоли после ее перевивки мышам. Видно, что наиболее сильный рост опухоли происходит между 4 и 7 сут. после перевивки.

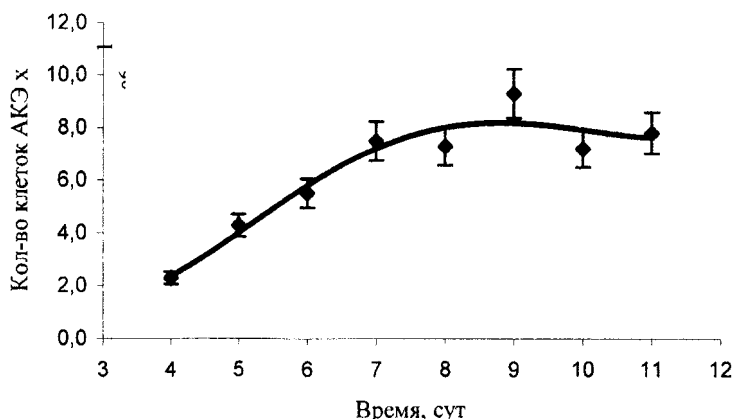
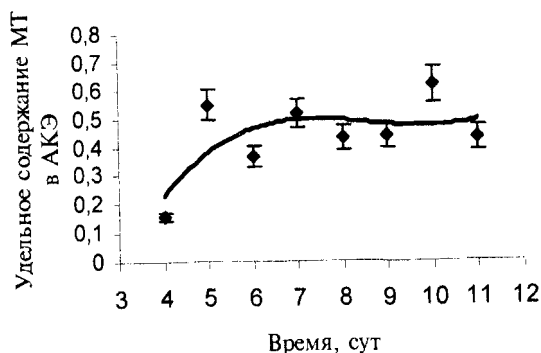
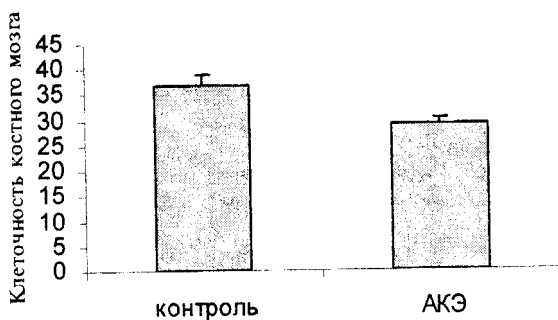


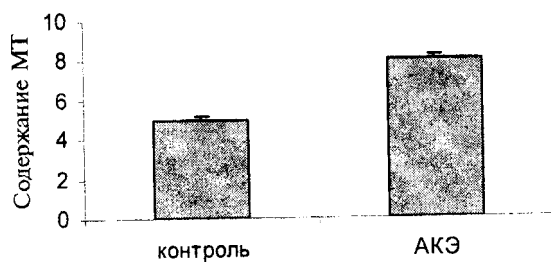
Рис. 1 Динамика клеточности АКЭ

Параллельно определяли удельное содержание МТ в этих клетках. Как видно из данных, представленных на рис. 2, увеличению числа опухолевых клеток соответствует увеличение удельного содержания МТ в них.

Одновременно с ростом опухоли уменьшается клеточность костного мозга мышей (рис. 3). Достоверно установлено, что на 7-е сут. после перевивки опухоли количество клеток в костном мозге составило $(29,0 \pm 2,2) \times 10^6$. В то же время количество клеток костного мозга в контроле составило $(37,0 \pm 2,5) \times 10^6$.

Рис.2 Изменение содержания МТ в клетках АКЭ, мкг/10⁶Рис. 3 Клеточность костного мозга x 10⁶ на 7 сут. после перевивки АКЭ

Отметим, что снижению клеточности костного мозга соответствует накопление МТ в этих клетках (рис. 4).

Рис. 4 Содержание МТ мкг/10⁶ в клетках костного мозга на 7-е сутки после перевивки АКЭ

Одновременно определяли содержание МТ в клетках печени. Известно, что в нормальных клетках печени у здоровых мышей удельное содержание МТ не изменяется с течением времени [3,4] и составляет $10,0 \pm 1,2$ мкг/г. Однако, если у животных развивается опухолевый процесс, то в клетках печени, которые не переродились в опухолевые, также отмечается динамика увеличения удельного содержания МТ. Аналогичное увеличение удельного содержания МТ в клетках печени наблюдалось в нашем эксперименте (рис. 5).

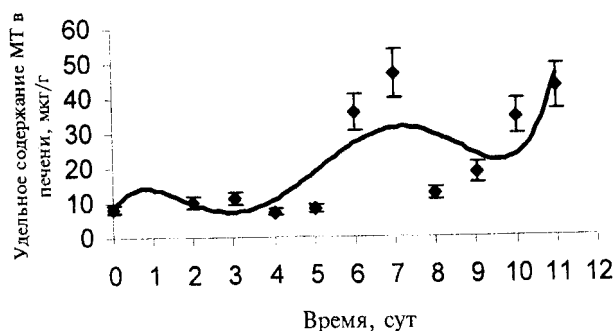


Рис. 5. Увеличение удельного содержания МТ в клетках печени

Установлено, изменение количества клеток костного мозга у мышей-опухоленосителей после подкожного введения ионов кадмия в концентрации 1 мг/кг. Количество клеток костного мозга после действия ионов кадмия составляет $(36 \pm 2) \times 10^6$ клеток, тогда как в группе мышей-опухоленосителей, которым не вводили кадмий, количество клеток костного мозга составляет $(29,0 \pm 2,2) \times 10^6$ (рис. 6). Таким образом, кадмий защищает от повреждающего действия токсичных веществ, выделяемых опухолью, и количество клеток костного мозга становится сравнимым с контролем.

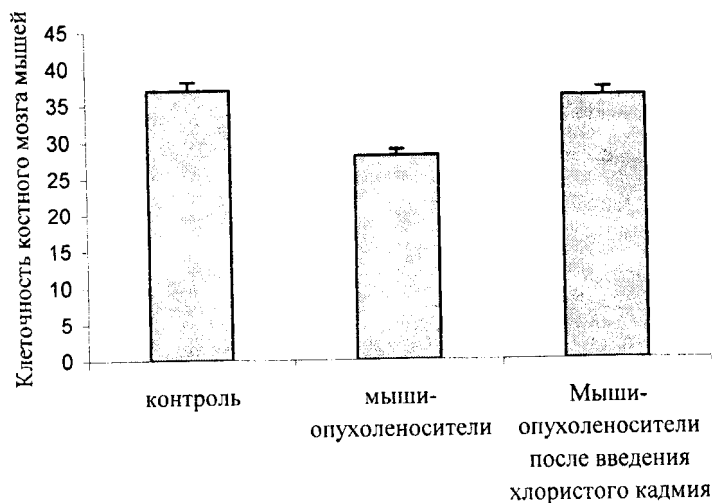


Рис. 6. Клеточность костного мозга мышей $\times 10^6$ на 7-е сутки в контроле, после перевивки АКЭ и после подкожного введения ионов кадмия мышам-опухоленосителям в концентрации 1 мг/кг массы тела мыши

На рис. 7 представлены данные по содержанию МТ в клетках костного мозга у мышей-опухоленосителей после введения им ионов кадмия. Показано, что при подкожном четырехкратном введении ионов кадмия достоверно увеличивается удельное содержание МТ в клетках костного мозга.

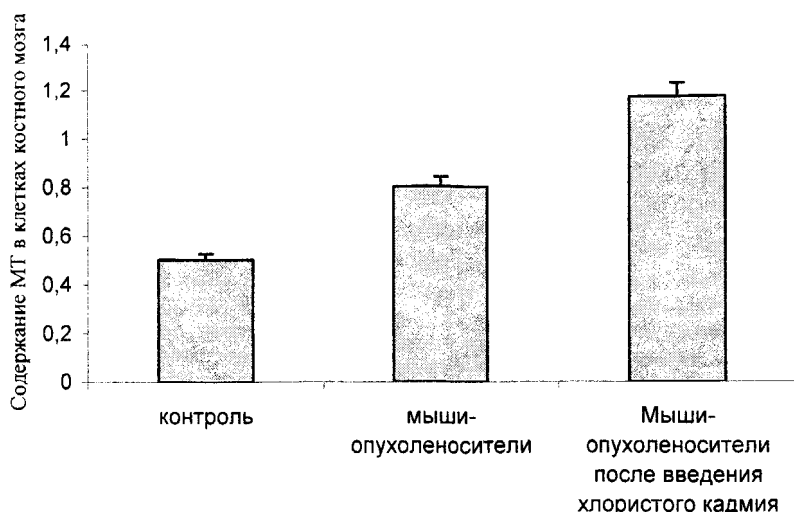


Рис. 7. Содержание МТ в клетках костного мозга на 7-е сут. в контроле, мышах-опухоленосителях, после подкожного введения ионов кадмия в концентрации 1 мг/кг

Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу участия белков-МТ в развитии опухолевого процесса. Вероятно, что МТ благодаря наличию антиоксидантных свойств инактивируют свободно радикальные процессы, тем самым защищая от повреждения клетки костного мозга. Аналогичная тенденция увеличения МТ отмечена для печени мышей. Наибольшее увеличение удельного содержания МТ наблюдается в печени мышей, которым вводили ионы кадмия. Это количество достоверно увеличивается по сравнению с контрольной группой мышей-опухоленосителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klaassen C.D., Lehman-McKeeman L.D. Induction of metallothionein. // J. Amer. College Toxicol. -1989. - N 8. - P. 1315-1321.
2. Котеров А.Н., Филиппович И.В. Радиобиология металлотионеинов, // Радиц. биол. Радиоэкол. -1995. - Т. 35. - Вып. 2. - С. 162-180.
3. Yamamoto H., Takeda Y. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986. V. 85. N 2. P. 263-266.
4. Munk A.C., Longmire J.L. // Mol. Cell. Biol. - 1984. - V. 4. - P. 25-28.

THE MAINTENANCE OF METALLOTHIONEIN IN TUMORAL CELLS, CELLS OF THE BONE BRAIN AND THE LIVER OF MICE AT DEVELOPMENT OF TUMORAL PROCESS

I.A. Danilin¹, B.I. Sinsyns², O.A. Smoryzanova³

¹Faculty of Ecology, the Peoples' Friendship University of Russia, Podolskoe Shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia

²Medicine Radiological Science Center RAMS, Obninsk, Russia

³Faculty of Ecology, State Technical University of Atomic Energy, Studgorodok, Obninsk, Russia

In the given work the role of proteins-MT was investigated at development of tumoral process in mice. For this purpose defined specific maintenance MT in cells growing Ehrlich's ascites tumor (EAT), and also in cells of a liver and a bone brain. It is shown, that growth of a tumour causes decrease in quantity of cells of a bone brain in mice-cancer carrier. Introduction CdCl₂ leads to restoration cells up to a level of the control, over it introduction CdCl₂ to mice-cancer carrier increases the maintenance of proteins metallothionein (MT) in cells of a bone brain and liver