

## РОЛЬ NAD(P)H В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Т.Н. Замай,  
А.С. Замай, А.А. Самойлова\*

*Работа посвящена исследованию роли NAD(P)H в регуляции пролиферативной активности трансформированных клеток асцитной карциномы Эрлиха и нормальных клеток в процессе эмбрионального развития и в условиях воздействия стрессогенных факторов окружающей среды. Выявлено, что в первые сутки после рождения, а также у взрослых животных в первые сутки воздействия холода на фоне резкого снижения уровня NAD(P)H происходит подавление клеточного роста. Увеличение срока адаптации стимулирует рост ткани и сопровождается постепенным повышением уровня NAD(P)H. Выдвигается предположение о том, что NAD(P)H через образование активных форм кислорода участвует в регуляции роста клеточной массы.*

Исследование регуляции пролиферативной активности клеток очень актуально, поскольку захватывает большой круг проблем, начиная от проблемы регенерации поврежденных тканей и эмбрионального развития до опухолевого роста. С практической точки зрения такие исследования необходимы, так как контроль над скоростью деления клеток позволит решить задачу подавления неконтролируемого роста опухолевых тканей, с одной стороны, а с другой - в случае необходимости ускорить процесс деления клеток при регенерации поврежденных тканей.

Клеточный цикл строго регулируется с помощью циклин-зависимых киназ, которые сами находятся под контролем множества других факторов, в результате чего в норме скорость деления клеток всегда адекватна потребностям организма как единого целого. Таким образом, скорость деления и количество клеток всегда строго контролируется организмом. Одним из факторов, оказывающих воздействие на пролиферативную активность клеток [1,2], являются активные формы кислорода, которые способны модифицировать конформацию макромолекул и таким образом контролировать интенсивность клеточного метаболизма. Предполагается даже, что регуляторная роль окислительно-восстановительного гомеостаза более важна, чем контроль с помощью внутриклеточной АТФ [3]. О важности такой регуляции свидетельствует множество экспериментальных данных, показывающих роль активных форм кислорода в кратковременных изменениях многих параметров клеточного гомеостаза, таких как факторы транскрипции NF- $\kappa$ B, AP-1, Ca<sup>2+</sup>, pH и другие [4,5]. Поэтому тонкий внутриклеточный баланс между окисляющими и восстанавливающими эквивалентами - важный механизм регуляции функций клетки. Сам редокс-потенциал определяется балансом окислительно-восстановительных эквивалентов в динамическом равновесии, основную роль в котором играют 3 пары – NAD<sup>+</sup>/NADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH и GSH/GSSG, причем метаболические волны NAD(P)H ответственны за реализацию передачи межклеточных сигналов [6] через образование супероксидных радикалов.

---

\* © Т.Н. Замай, А.С. Замай, А.А.Самойлова, Красноярский государственный университет, 2006, [szamay@akadem.ru](mailto:szamay@akadem.ru)

Данные о влиянии активных форм кислорода на пролиферативную активность клеток достаточно противоречивы [1]. Более того, экспериментальные факты свидетельствуют о различном эффекте активных форм кислорода на скорость деления нормальных и трансформированных клеток. Некоторые авторы используют величину уровня NAD(P)H в качестве показателя интенсивности свободно-радикального окисления [6].

Целью работы стало сопоставление уровня NAD(P)H и скорости роста нормальных и опухолевых тканей.

### Материалы и методы исследований

Эксперименты выполнены на белых мышах-самцах ICR и белых беспородных крысах. Животные содержались в условиях вивария при температуре  $23 \pm 2$  °C без ограничения в воде и пище. Адаптацию крыс к холоду проводили при температуре  $6 \pm 2$  °C.

Объектом исследования служили асцитные клетки карциномы Эрлиха, изолированные на 5-16 сутки после их внутрибрюшинной трансплантации в количестве 3 млн клеток белым мышам ICR, и клетки почек эмбрионов и новорожденных крысят, а также животных в возрасте 1 и 4 недель.

Выделение асцитных клеток производили на 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 сутки после трансплантации опухоли. Весь асцит из брюшной полости собирали автоматической пипеткой, брюшину трижды промывали физиологическим раствором для удаления всех клеток. Для осаждения клеток весь асцит центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут. Собранные клетки трижды отмывали в среде Хенкса, содержащей (мМ): NaCl – 140, KCl – 5.4, CaCl<sub>2</sub> – 1.3, MgSO<sub>4</sub> – 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1, NaHCO<sub>3</sub> – 1, глюкозу – 6, HEPES – 10, pH 7.2. Для подсчета концентрации асцитных клеток в опухоли использовали камеру Горяева.

Выделение клеток корковой зоны почек осуществляли с помощью коллагеназы [7].

Собственную флуоресценцию NAD(P)H определяли на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) в течение 2 минут при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 450 нм. В пробе содержался 1 млн отмытых клеток, ресуспендированных в 2 мл раствора Хенкса.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программах Origin 5.0 и Статистика 7.

### Результаты исследований

При исследовании динамики роста асцитной карциномы Эрлиха мы обнаружили, что кривая роста отличалась от классической S-образной. Вначале наблюдалась фаза экспоненциального роста (рис.1), характеризующаяся быстрым накоплением биомассы, во время которого количество клеток увеличилось с  $(0,80 \pm 0,06) \times 10^8$  до  $(5,20 \pm 0,61) \times 10^8$  клеток (3–7-е сутки после трансплантации асцитных клеток). Затем экспоненциальный рост сменялся линейным (7–11-е сутки), при этом количество асцитных клеток увеличилось до  $(12,2 \pm 1,05) \times 10^8$ .

Отличительной особенностью кривой роста в наших экспериментах был необычный спад числа асцитных клеток на 12-е сутки до  $(6,8 \pm 0,80) \times 10^8$  клеток ( $P < 0,01$ ) и следующий за ним резкий подъем их количества до  $(9,7 \pm 0,10) \times 10^8$  клеток ( $P < 0,05$ ) на 13-е. Количество клеток увеличилось до  $(20,10 \pm 1,50) \times 10^8$  клеток ( $P < 0,001$ ) к 14-м суткам, затем следовала фаза отмирания культуры. При этом общее количество клеток в опухоли снижалось к 16-м суткам до  $(16,7 \pm 0,86) \times 10^8$  клеток.

О скорости деления асцитных клеток можно судить по митотическому индексу - показателю митотической активности ткани, представляющему собой долю делящихся путем митоза клеток к общему количеству клеток (рис.2). Этот показатель является достаточно информативным, поскольку коррелирует со многими показателями, характеризующими пролиферативную клеточную активность [8]. Поэтому для получения дополнительных доказательств о снижении пролиферативной активности на 11-е сутки мы определили динамику митотического индекса в процессе роста асцитной карциномы Эрлиха.

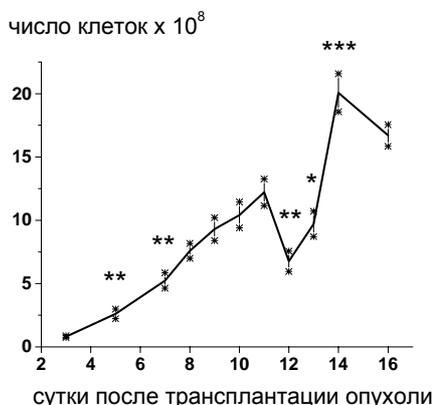


Рис. 1. Динамика роста асцитной карциномы Эрлиха (N – 18-20 животных на точку): \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

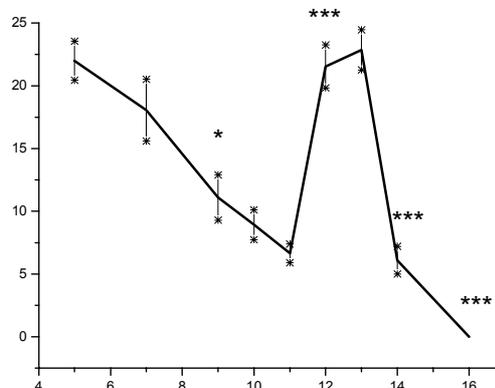


Рис.2. Изменение митотического индекса асцитных клеток в динамике роста опухоли: \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

Результаты исследований показали, что величина митотического индекса изменялась в процессе роста опухоли. Так, на пятые сутки митотический индекс составлял  $22,0 \pm 1,6$  %, затем постепенно снижался и на 11-е сутки становился равным  $6,7 \pm 0,8$  % ( $P < 0,001$ ). 12-е сутки характеризовались величиной индекса, равной  $21,5 \pm 1,7$  % ( $P < 0,001$ ). На 13-е сутки митотический индекс еще немного увеличился (до  $22,9 \pm 1,6$  %), а затем на 14-е сутки снизился до  $6,1 \pm 1,09$  % ( $P < 0,001$ ). К 16-м суткам, в терминальную фазу роста, асцитные клетки практически полностью прекращали деление.

Результаты исследований собственной флуоресценции NAD(P)H показали, что с 5-х и до 11-х суток интенсивность флуоресценции NAD(P)H постепенно уменьшалась (рис.3), а на 12-е сутки происходило резкое увеличение флуоресценции NAD(P)H с  $0,064 \pm 0,005$  усл. ед. до  $0,105 \pm 0,011$  усл. ед. ( $P < 0,01$ ) и затем она уменьшилась до  $0,060 \pm 0,005$  усл. ед. ( $P < 0,01$ ).

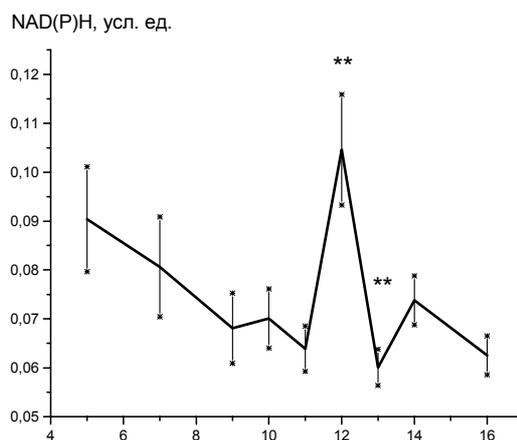


Рис. 3. Изменение собственной флуоресценции NAD(P)H в клетках асцитной карциномы Эрлиха: \*\*  $P < 0,01$

Таким образом, увеличение уровня NAD(P)H в асцитных клетках совпадало со стимуляцией роста опухоли, а снижение уровня NAD(P)H – с подавлением митотической активности клеток.

Для того чтобы оценить роль NAD(P)H в регуляции пролиферативной активности нормальных клеток, мы поставили два модельных эксперимента, в которых рост тканей был стимулирован. Первая модель - рост ткани в онтогенезе, второй - адаптивное увеличение массы органа под влиянием экстремального фактора (холода).

Любое, даже небольшое, экстремальное воздействие на первых этапах, в течение первых нескольких часов, вызывает подавление процессов пролиферации, что было неоднократно доказано. Согласно теории клеточного стресса, разрабатываемой Тодоровым [9], это происходит в ответ на нарушение белкового гомеостаза, вызванное подавлением синтеза белка. При этом в клетке формируется функциональная система, направленная на восстановление трансляции, которая активирует пролиферативную способность клеток, в результате чего возникает гиперплазия. Поэтому модель адаптации к воздействию стрессогенного фактора очень удобна для изучения регуляции пролиферативной активности клеток.

В качестве стрессогенного фактора был выбран холод. Исследования показали, что в течение первых суток относительная масса почек не изменялась и составляла  $0,69 \pm 0,02$  %, через 2 недели она возростала до  $0,78 \pm 0,02$  % и в течение последующих двух недель продолжала увеличиваться (табл.1). Масса животных при этом также продолжала возрастать (табл.1), т.е. увеличение относительной массы почек не было связано со снижением массы тела адаптирующихся животных.

Таблица 1

**Изменение относительной массы почек, массы тела и уровня NAD(P)H у адаптирующихся к холоду крыс**

Показатель	Контроль	Адаптация, часы			Адаптация, недели	
		1	3	15	2	4
Относительная масса почек, %	$0,69 \pm 0,02$ (n=20)	$0,68 \pm 0,02$ (n=10)	$0,69 \pm 0,02$ (n=10)	$0,69 \pm 0,02$ (n=10)	$0,78 \pm 0,02^*$ (n=16)	$0,80 \pm 0,03^*$ (n=16)
Масса тела, г	$150 \pm 12,5$ (n=20)	$149 \pm 15,0$ (n=10)	$150 \pm 20$ (n=10)	$150 \pm 16$ (n=10)	$200 \pm 16,1^*$ (n=20)	$230 \pm 20,0^*$ (n=20)
NAD(P)H, отн. ед.	$0,22 \pm 0,04$ (n=20)	$0,21 \pm 0,04$ (n=10)	$0,14 \pm 0,03^*$ (n=10)	$0,07 \pm 0,01^*$ (n=10)	$0,12 \pm 0,01^*$ (n=16)	$0,12 \pm 0,01^*$ (n=16)

Примечание: \* -  $P < 0,01$  относительно контроля.

Подобная зависимость увеличения массы тела и изменения относительной массы почек наблюдались и в онтогенезе (табл.2).

Таблица 2

Изменение относительной массы почек, массы тела и уровня NAD(P)H у крыс в онтогенезе

Показатель	Эмбрионы	Возраст		
		1 день	1 неделя	4 недели
Относительная масса почек, %	0,93±0,05 (n=19)	0,81±0,03* (n=11)	0,99±0,03 (n=15)	1,10±0,04* (n=12)
Масса тела, г	4,2±0,3 (n=19)	5,5±0,1 * (n=11)	10,8±0,7* (n=15)	27,6±2,9* (n=12)
NAD(P)H, отн. ед	0,18±0,02 (n=16)	0,12±0,001** (n=10)	0,14±0,01 (n=10)	0,16±0,01 (n=10)

Примечание: \* - P<0,01 относительно эмбрионов, \*\* - P<0,02 относительно эмбрионов.

Определение уровня NAD(P)H в корковой зоне почек крыс при адаптации к холоду показало, что через 1 час после воздействия холода изменений уровня NAD(P)H в почках не зафиксировано (рис.3), но через 3 часа он был резко снижен. Падение уровня NAD(P)H продолжалось в течение 15-ти часов, но более длительная адаптация к холоду (2 и 4 недели) приводила к повышению уровня NAD(P)H в почках. Подобным образом вела себя кривая изменения уровня NAD(P)H в почках крыс в условиях онтогенеза (рис.4). Так, в клетках почек крысят в первый день после рождения уровень флуоресценции NAD(P)H резко снижался, а затем в течение последующих 4-х недель постепенно возрастал.

Расчет коэффициента корреляции с помощью непараметрического критерия Вилкоксона показал, что зависимость между изменениями митотического индекса асцитных клеток и уровнем в них NAD(P)H, а также относительной массой почек и уровнем в них NAD(P)H в онтогенезе и при адаптации к холоду очень высока, P<0,001.

#### Обсуждение результатов исследования

В последние годы значительно возрос интерес к биологическим эффектам активных форм кислорода в связи с их участием в передаче внутриклеточного сигнала, в частности с их способностью активировать ряд транскрипционных факторов. В малых концентрациях активные формы кислорода стимулируют те же клеточные функции, что и многие естественные активаторы (рост, пролиферацию, секрецию, локомоцию, фагоцитоз, синтез белков). При этом они действуют на те же звенья каскада сигналов, что и естественные активаторы, в частности на активность тирозинкиназ, фосфолипаз, MAPкиназ, ионных каналов плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума, на фосфорилирование белков по тирозину, концентрацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, pH.

Установлено, что уровень NAD(P)H в клетке отражает степень ее окислительно-восстановительного статуса [6]. Причем осцилляции уровня NAD(P)H отражают колебания активных форм кислорода, поскольку NAD(P)H – один из наиболее важных факторов их образования. В частности, повышение уровня NAD(P)H сопровождается ростом уровня активных метаболитов кислорода. Доказано, что NAD(P)H участвует в регуляции пролиферативной активности клеток [1-3]. Хотя механизм этой регуляции пока не установлен, известно, что он не вызван активацией экспрессии генов, контролирующего клеточный цикл. Вероятно, механизм действия NAD(P)H на скорость клеточного деления связан с образованием активных форм кислорода, которые участвуют в модификации конформации макромолекул, контролирующего клеточный цикл.

В наших исследованиях показана полная корреляция скорости роста клеточной массы трансформированных клеток асцитной карциномы и нормальных клеток в процессе индивидуального развития и в условиях действия холода с динамикой уровня NAD(P)H. Причем четко прослеживается однонаправленность изменений. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что, во-первых, NAD(P)H прямо или опосредованно участвует в регуляции роста ткани и, во-вторых, механизмы этой регуляции в нормальных и трансформированных клетках в целом похожи. В то же время, если судить по величине различий в уровне NAD(P)H между разными клетками (нормальными и трансформированными), можно прийти к выводу, что активные метаболиты кислорода в разных клетках по-разному участвуют в регуляции клеточного цикла. Так, при снижении величины митотического индекса асцитных клеток с 22,0±1,6 до 6,7±0,8 % уровень флуоресценции NAD(P)H упал всего лишь на 0,026 отн.ед. При подавлении роста почек вследствие родового стресса (в первый день после рождения) падение уровня флуоресценции было уже больше и составило 0,06 отн. ед. Самым высоким было снижение уровня флуоресценции NAD(P)H по сравнению с эмбриональными при стрессе, вызванном воздействием холода, – 0,15 отн. ед. Увеличение NAD(P)H при стимуляции процессов пролиферации в разных клетках оказалось сопоставимым – примерно 0,04 отн. ед.

Таким образом, в наших экспериментах прослеживалась четкая взаимосвязь между снижением уровня флуоресценции NAD(P)H и подавлением пролиферативной активности клеток. Это позволяет сделать вывод о том, что NAD(P)H участвует в регуляции роста клеточной массы через образование активных форм кислорода.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса/ Е.Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т.47, вып.6. – С. 561-581.
2. Das D. K. and Maulik N. Conversion of Death Signal into Survival Signal by Redox Signaling/ D. K. Das // Biochemistry (Moscow). – 2004. – V.69, - N1. – P. 16-24.
3. Karu T.I. Photobiology of Low-Power Laser therapy/ T.I. Karu. London: Harwood Acad..Publ., 1989.
4. O’Loughlen A., Perez-Morgado M.I., Salinas M., Martin M.E. N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways/ A.O’Loughlen //Cellular Signalling. – 2006. – V.18, N1. P.21-31.
5. Oberley L. W., Oberley T. D., Buettner C. R. Cell differentiation, aging and cancer. The possible role of superoxide and superoxide dismutase/ L. W. Oberley // Med. Hypotheses. - 1980. - V. 6. P.249-268.
6. Nakamura J., Asakura S., Hester S.D., et al. Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time/ Nakamura J.// Nucleic Acids Research. – 2003. - V.31, N17. – P.104-110.
7. Зиганшин А.У. Фармакология рецепторов АТФ/ А.У. Зиганшин, Л.Е. Зиганшина. - М.: ГЭОТАР Медицина, 1999.
8. Vincent-S.A, Rousseau A., Jouve M. et al. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline –based preoperative chemotherapy/ S.A. Vincent // Eur J Cancer. – 2004. V.40, N10. P. 1502–1508.
9. Тодоров Н.И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция/ Н.И. Тодоров, Г.И. Тодоров. - М.: Наука, 2003. - 471с.

### INFLUENCE OF NAD(P)H ON THE GROWTH OF CELL POPULATION

**T. N. Zamay,  
A. S. Zamay, A.A.Samoilova**

*Influence of NAD(P)H on regulation of the proliferation of Ehrlich adenocarcinoma ascite cells, embrion cells and cells under the stress were studied in the present work. We revealed that the level of NAD(P)H on cells was determined by the stage of tissue growth. We suppose that NAD(P)H participates in regulation of the cell population grows.*