

УДК 577.342

ДОНОР СЕРОВОДОРОДА NaHS ЗАЩИЩАЕТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ И МЕЛАНОМНЫЕ КЛЕТКИ ОТ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2019 г. Н. В. Андреева^а, К. В. Зотов^б, В. И. Юсупов^б, А. В. Белявский^{а, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Троицк, Москва, 108840 Россия

*e-mail: abelyavs@yahoo.com

Поступила в редакцию 17.09.2018 г.

После доработки 13.11.2018 г.

Принята к публикации 14.11.2018 г.

Ранее мы установили, что инфракрасное лазерное излучение с длиной волны 835 нм вызывает дозозависимое торможение роста мезенхимальных стволовых и меланомных клеток человека и способно вызвать гибель меланомных клеток. В настоящей работе показано, что донор сероводорода NaHS способен защищать клетки обоих типов от негативного воздействия лазерного излучения, при этом величина защитного эффекта зависит от концентрации NaHS. Механизм защиты клеток обусловлен, главным образом, воздействием NaHS на внутриклеточные процессы, происходящие после облучения, поскольку защитный эффект не зависит от времени добавления NaHS — до или после облучения. Более того, защитное действие наблюдается даже при добавлении NaHS через 6 ч после облучения.

Ключевые слова: сероводород, инфракрасное лазерное облучение, меланома, мезенхимальные стволовые клетки, цитотоксичность

DOI: 10.1134/S0026898419020022

ВВЕДЕНИЕ

Сероводород (H₂S), роль которого в биологических системах ранее сводили к токсическим эффектам, в настоящее время рассматривается как один из трех важнейших вторичных посредников газообразной природы наряду с NO и CO [1, 2]. На протекторную функцию H₂S в различных физиологических процессах указывает значительное число публикаций. В частности, H₂S проявляет противовоспалительную активность [3], защищает кровеносные сосуды и уменьшает повреждения миокарда при ишемической болезни [4], причем последнее достигается за счет воздействия на митохондрии [5].

Недавно мы показали, что инфракрасное лазерное излучение с длиной волны 835 нм влияет на рост меланомных клеток человека [6, 7]. При малых дозах облучения наблюдается стимуляция роста, в то время как высокие дозы приводят к прогрессирующему подавлению роста и даже гибели клеток. Сходные эффекты наблюдаются и при лазерном облучении мезенхимальных ство-

ловых клеток (МСК) человека, однако эти клетки значительно более устойчивы к негативному действию излучения. Согласно опубликованным данным, инфракрасное излучение действует главным образом через митохондриальную цитохром-*c*-оксидазу [8, 9]. Поскольку митохондрии также могут служить мишенью H₂S [10], высокие концентрации которого способны ингибировать цитохром-*c*-оксидазу [11], интересно было понять, может ли H₂S модифицировать негативные эффекты инфракрасного излучения на клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток. Культивирование клеток метастатической меланомы кожи Mel 1L и МСК описано ранее [7]. Клетки Mel 1L культивировали до 50–60% монослоя в условиях нормоксии в среде RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), 2 мМ глутамин, пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Препарат МСК из костного мозга эмбриона человека (FetMSC, из

Сокращения: МСК — мезенхимальные стволовые клетки.

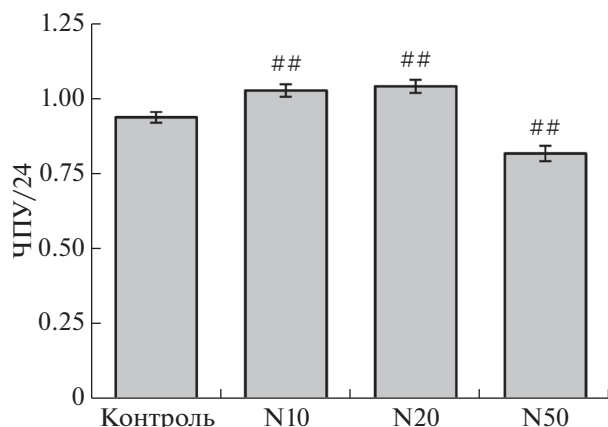


Рис. 1. Влияние NaHS на рост клеток меланомы Mel II. Контроль – клетки, к которым не добавляли NaHS. N10, N20 и N50 – клетки, к которым добавляли 10, 20 и 50 мкМ NaHS соответственно. Клетки культивировали в течение 1 суток при нормоксии. По оси ординат – интегральный показатель числа популяционных удвоений, пройденных культурой за 24 ч (ЧПУ/24); значение 1.0 соответствует одному удвоению в течение 1 суток. Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. $p < 0.01$ (##) по сравнению с контролем.

коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”) с низкой концентрацией глюкозы (1000 мг/л), содержащей 10% ЭТС, 2 мМ глутамина, пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). МСК культивировали в мультигазовом CO₂ инкубаторе в условиях гипоксии (5% O₂) до 50–60% монослоя. Для пассирования клетки снимали с пластика в 0.25% растворе трипсина (“Sigma-Aldrich”, США) в 1× фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с 0.02% EDTA при 37°C в течение 2–3 мин (меланомные клетки) и 7–10 мин (МСК человека), промывали 1 раз, центрифугируя в течение 7 мин при 367 g в среде RPMI и DMEM соответственно. Далее меланомные клетки рассеивали в соотношении 1 : 8, а МСК – 1 : 4.

Облучение клеток. Клетки снимали трипсином, как описано выше, подсчитывали в камере Горяева и рассеивали по 30000 клеток на культуральные чашки Петри диаметром 3.5 см. Клетки облучали при комнатной температуре с помощью описанной ранее [6, 7] инфракрасной лазерной установки с длиной волны излучения 835 нм без термостатирования. Использовали среднедозовый (90 кДж/м²) и высокодозовый (540 кДж/м²) режимы облучения меланомных клеток и МСК соответственно. Повышение температуры среды за время облучения не превышало 2 и 5°C при использовании среднедозового и высокодозового режимов соответственно.

После облучения клетки культивировали в течение 1 суток, снимали трипсином, после чего окра-

шивали 0.2%-ным трипановым синим и подсчитывали число живых клеток в камере Горяева. Каждый экспериментальный вариант выполняли в трех повторностях. Для повышения точности анализа число меланомных клеток в каждой повторности подсчитывали 3 раза, число МСК – 4 раза, и вычисляли среднее значение.

Интегральный показатель числа удвоений популяции, пройденных культурой, и нормированный на 24 ч культивирования (ЧПУ/24), подсчитывали согласно формуле:

$$\text{ЧПУ/24} = 24/T \lg_2(N_T : N_0),$$

где N_0 – число посеянных живых клеток, N_T – число снятых живых клеток после культивирования, T – время культивирования (ч). Этот показатель зависит как от скорости пролиферации, так и от уровня гибели клеток за период культивирования. В случае значительных цитотоксических воздействий, когда скорость гибели клеток превышает скорость их пролиферации, показатель принимает отрицательные значения, величина которых отражает степень цитотоксичности воздействия.

Обработка клеток NaHS. Препарат NaHS (“Sigma-Aldrich”) для предотвращения гидролиза растворяли в абсолютном этаноле до концентрации 250 мМ и хранили при –70°C не более 2 недель. Перед экспериментом готовили рабочие 50 и 100 мМ растворы NaHS в абсолютном этаноле. Непосредственно перед облучением клеток готовили двукратные растворы NaHS в полной среде, которые добавляли к равному объему клеточной культуры, после чего сразу же облучали. В некоторых опытах растворы NaHS добавляли сразу или через некоторое время после облучения клеток. В контрольные образцы клеток добавляли этанол до той же концентрации (0.02%), как и в экспериментальных образцах с NaHS.

Статистический анализ. При проведении статистического анализа (вычисление стандартных отклонений и статистической значимости по t -критерию Стьюдента) использовали статистические функции программы Excel (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможные эффекты H₂S при облучении клеток изучали с использованием NaHS в качестве донора сероводорода. В первую очередь анализировали влияние NaHS на рост линии меланомных клеток Mel II. С этой целью определяли скорость роста клеток в течение 24 ч в среде, содержащей NaHS в концентрации 10, 20 и 50 мкМ. Данные, приведенные на рис. 1, показывают, что добавление 10 и 20 мкМ NaHS приводит к небольшому, но статистически значимому ускорению роста клеток Mel II. В то же время присутствие 50 мкМ

NaHS оказывало небольшой, но значимый негативный эффект на рост клеток Mel II.

Далее было изучено влияние NaHS на меланомные клетки, подвергнутые воздействию инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 835 нм. Суспензию клеток, снятых с подложки помощью трипсина, облучали инфракрасным излучением (средняя доза, 90 кДж/м²). Затем клетки культивировали в течение 1 суток и подсчитывали количество живых клеток в камере Горяева. Приведенные на рис. 2 результаты этих экспериментов показывают, что в соответствии с полученными нами ранее данными [7] средние дозы лазерного излучения вызывают резкую остановку роста клеток, а также относительно небольшой уровень интегральной гибели клеток. В то же время, добавление NaHS в среду до концентрации 10, 20 и 50 мкМ перед облучением существенно ослабляло негативный эффект, что выражалось в существенном и статистически значимом увеличении числа клеток после культивирования по сравнению с облученным образцом, не содержащим NaHS. Ослабление эффекта облучения носило дозозависимый характер. Наиболее значительная нейтрализация наблюдалась при 50 мкМ NaHS, хотя те же концентрации NaHS, наоборот, негативно действовали на необлученные клетки. Таким образом, NaHS оказывает именно протективный эффект, поскольку связан с частичной нейтрализацией негативных эффектов облучения, а не с общей стимуляцией клеточного роста.

Далее мы оценили возможность протективного действия NaHS при инфракрасном облучении не только клеточных линий, но и первичных клеток, в качестве которых использовали МСК человека. Сначала, как и в случае Mel II, изучили действие NaHS на рост МСК в течение 24 ч при гипоксии (5% O₂). Данные, приведенные на рис. 3, показывают, что возможные эффекты NaHS в концентрации 10 и 20 мкМ на рост МСК статистически незначимы, в то время как 50 мкМ NaHS вызывал небольшое, но статистически значимое подавление роста МСК, как это показано и на меланомных клетках Mel II.

На рис. 4 приведены результаты изучения эффектов NaHS при облучении МСК. Поскольку, как показано нами ранее, МСК значительно более устойчивы к действию облучения, чем меланомные клетки [7], снижение числа МСК по сравнению с контролем было менее значительным, даже несмотря на высокую дозу облучения (540 кДж/м²). Тем не менее, при добавлении NaHS, как и в случае с меланомными клетками, наблюдалось статистически значимое снижение негативного эффекта облучения на МСК. Таким образом, NaHS оказывает дозозависимое протективное действие и при облучении МСК высокими дозами инфракрасного лазерного излучения.

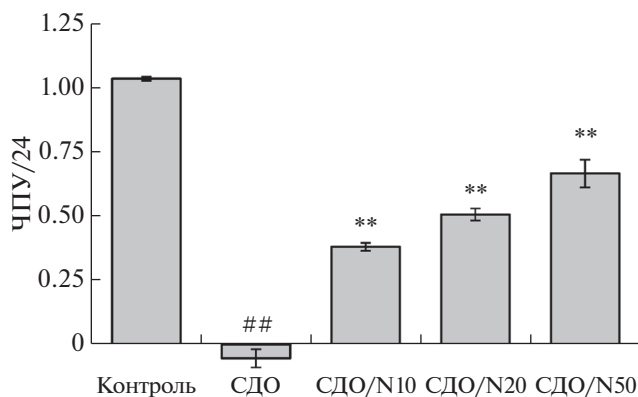


Рис. 2. Присутствие NaHS защищает клетки Mel II от негативного действия инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 835 нм. Контроль – клетки без облучения и без добавления NaHS. СДО – клетки, подвергнутые среднедозовому лазерному облучению (интенсивность 1500 Вт/м², длительность 1 мин, доза 90 кДж/м²). СДО/Н10, СДО/Н20 и СДО/Н50 – клетки, облученные в присутствии 10, 20 и 50 мкМ NaHS соответственно. Клетки культивировали в течение 1 суток в условиях нормоксии. Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. $p < 0.05$ (#) и $p < 0.01$ (##) по сравнению с контролем; $p < 0.05$ (*) и $p < 0.01$ (**) по сравнению с СДО. Прочие обозначения, как на рис. 1. Отрицательные значения ЧПУ/24 соответствуют абсолютному уменьшению числа живых клеток после культивирования.

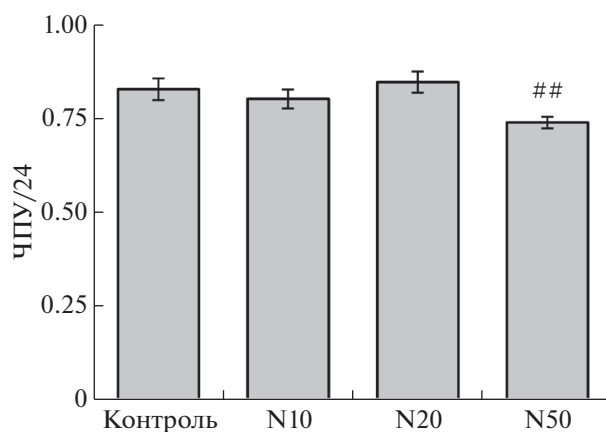


Рис. 3. Влияние NaHS на рост МСК человека. Контроль – клетки, к которым не добавляли NaHS. N10, N20 и N50 – клетки, к которым добавляли NaHS в концентрации 10, 20 и 50 мкМ соответственно. Клетки культивировали в течение 1 суток в условиях гипоксии. По оси ординат – интегральный показатель числа удвоенной популяции, пройденных культурой за 24 ч (ЧПУ/24). Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. $p < 0.01$ (##) по сравнению с контролем.

Наблюдаемый эффект, как и в случае Mel, не может быть объяснен простой стимуляцией роста МСК, поскольку в концентрации 50 мкМ, вызывающей наибольший эффект, NaHS приводит к значимому подавлению роста.

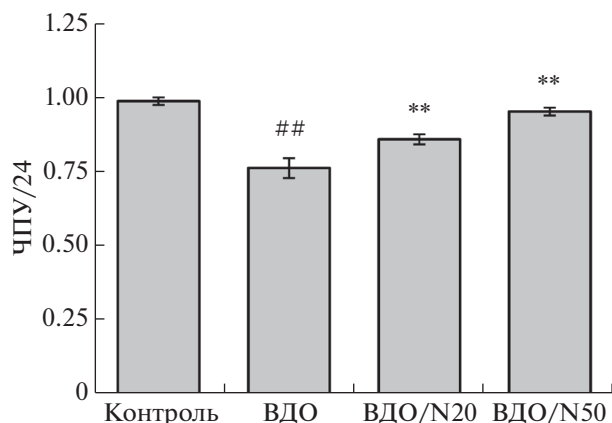


Рис. 4. Присутствие NaHS защищает МСК человека от негативного действия инфракрасного лазерного излучения. Контроль – клетки без облучения и добавления NaHS. ВДО – клетки, подвергнутые высокодозовому лазерному облучению (интенсивность 1500 Вт/м², длительность 6 мин, доза 540 кДж/м²). ВДО/N20 и ВДО/N50 – клетки, подвергнутые высокодозовому облучению в присутствии 20 и 50 мкМ NaHS соответственно. Клетки культивировали в течение 1 суток в условиях гипоксии. Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. Прочие обозначения, как на рис. 2.

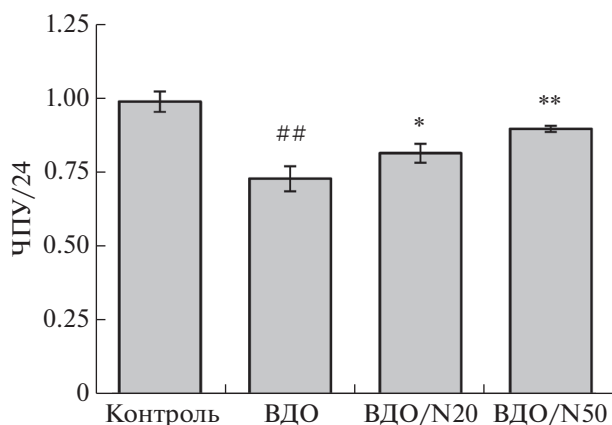


Рис. 5. NaHS способен защищать МСК человека от негативного действия инфракрасного лазерного излучения и при добавлении после облучения. Клетки культивировали в течение 1 суток в условиях гипоксии (5% O₂). Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. Эксперимент проводили, как на рис. 4, но NaHS добавляли сразу после облучения. Прочие обозначения, как на рис. 1.

Существует вероятность того, что протективное действие NaHS сводится к нейтрализации его влияния непосредственно при облучении (в частности, за счет нейтрализации короткоживущих свободных радикалов, которые, предположительно, могли образоваться в среде в момент облучения). Для проверки этой гипотезы мы провели эксперимент, в котором NaHS добавляли к клет-

кам МСК не до, а после облучения. Полученные данные (рис. 5) показывают, что в этом случае характер воздействия NaHS на клеточный рост не изменился и, более того, даже количественные показатели эффектов NaHS (изменения ЧПУ/24 по сравнению с облученным контролем) остались такими же (в пределах вариаций между экспериментами). Таким образом, протективные эффекты NaHS связаны, главным образом, с воздействием на процессы, происходящие в клетках после облучения, а не с непосредственной нейтрализацией действия самого излучения.

Далее мы определяли продолжительность негативных процессов в облученных клетках, действие которых нейтрализует NaHS. В качестве клеточной модели использовали клетки Mel IЛ, которые характеризуются более выраженным ответом на облучение. Клетки подвергали воздействию средней дозы облучения, при этом NaHS добавляли в наиболее эффективной концентрации 50 мкМ до, сразу после, или через 1, 2 или 6 ч после облучения. Из рис. 6а видно, что хотя эффект NaHS при отложенном добавлении постепенно снижается, тем не менее он способен оказывать значительное защитное воздействие даже через 6 ч после облучения.

Проведенный эксперимент, хотя и дал ценную информацию, оставил определенные неясности в том, что касается защитного действия NaHS непосредственно на рост клеток. Это связано с тем, что в данном опыте, как и во всех предыдущих, облучали клетки, находящиеся в суспензии, а не в прикрепленном к пластику состоянии. В то же время, ранее мы показали, что облучение негативно воздействует не только на рост меланомных клеток, но и на предшествующую стадию прикрепления клеток к субстрату, что вносит существенный вклад во влияние облучения на интегральный рост клеток [7]. Прикрепление меланомных клеток происходит преимущественно в первые 2 ч и в основном заканчивается за 4 ч, вследствие чего добавление NaHS через 2–6 ч после облучения вряд ли может эффективно нейтрализовать его негативное действие. На основании этих соображений мы повторили эксперимент в варианте, когда облучали прикрепленные к пластику клетки. Показано (рис. 6б), что в прикрепленном состоянии клетки Mel IЛ существенно более устойчивы к действию излучения, что подтверждает полученные нами ранее данные [7]. Таким образом, значительная часть негативных эффектов облучения на состояние клеток Mel IЛ в суспензии связана либо с предположительно более высокой чувствительностью неприкрепленных к субстрату клеток к облучению, либо с торможением их прикрепления к субстрату, что может приводить к гибели клеток по механизму апоптоза [12]. Из рис. 6б видно, что NaHS нейтрализует, хотя и не полностью, негативные эф-

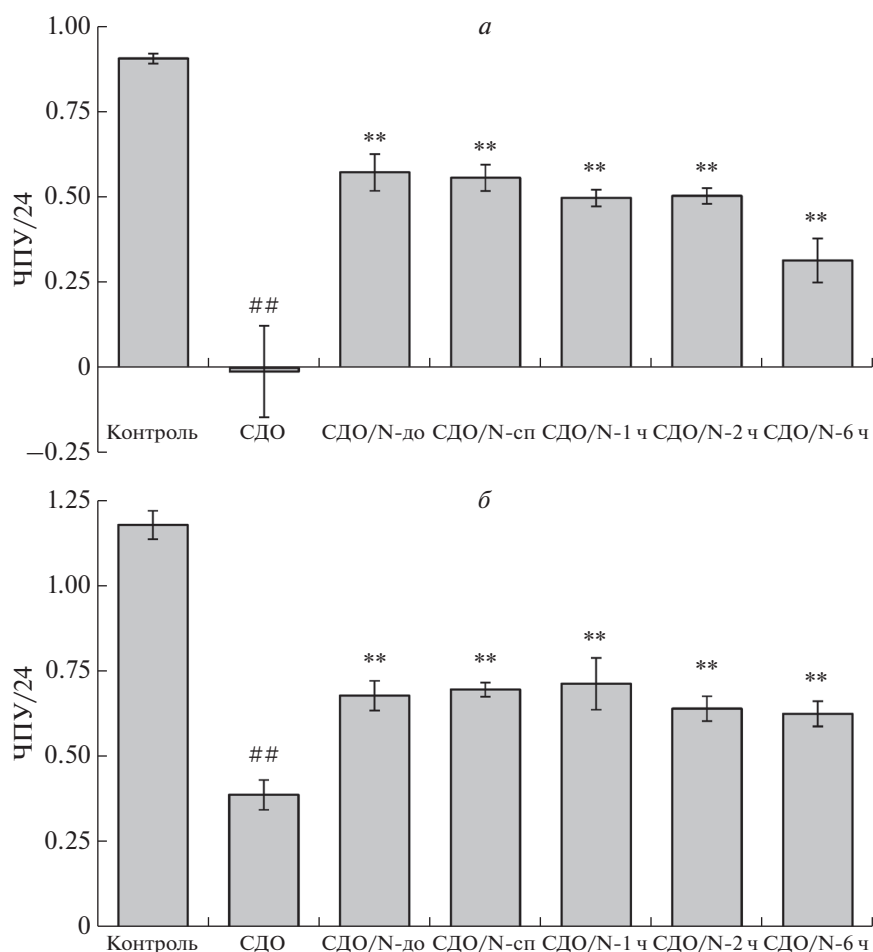


Рис. 6. NaHS способен защищать клетки Me1 II от негативного действия инфракрасного лазерного излучения даже через несколько часов после облучения. *а* – Облучение клеток в суспензии; *б* – облучение прикрепленных клеток. Клетки подвергали лазерному облучению в средней дозе (СДО) (интенсивность 1500 Вт/м², длительность 1 мин, доза 90 кДж/м² и 1 мин 45 с, доза 157.5 кДж/м² для суспензионных и прикрепленных клеток соответственно) и культивировали в течение 1 суток в условиях нормоксии. NaHS добавляли до концентрации 50 мкМ до облучения (СДО/N-до), сразу после (СДО/N-сп) или через 1, 2 и 6 ч после облучения (СДО/N-1 ч, СДО/N-2 ч и СДО/N-6 ч соответственно). Контроль – клетки без облучения и без добавления NaHS. Показаны средние значения (три повтора) и квадратичные отклонения. $p < 0.01$ (##) по сравнению с контролем, $p < 0.01$ (***) по сравнению с СДО. Прочие обозначения, как на рис. 1.

факты облучения на рост прикрепленных клеток. Хотя при задержанном добавлении NaHS (через 2 и 6 ч) наблюдается небольшое снижение защитного эффекта, однако это снижение не является статистически значимым. Поэтому можно предположить, что защитный эффект NaHS сохраняется и при более позднем, чем 6 ч, добавлении к облученным клеткам.

Механизм протективного действия NaHS при облучении остается неясным, однако можно предположить, что NaHS ингибирует процессы апоптоза и некроза, вызванные действием высоких доз инфракрасного излучения [7]. Стоит отметить, что антиоксидантное действие сероводорода описано в ряде публикаций. Так, H₂S защищает эндотелиальные клетки от вызванного пероксидом водорода окислительного стресса и митохондриаль-

ной дисфункции [13]. H₂S также способен снижать образование пероксида водорода и супероксидного аниона в гладкомышечных клетках сосудов, вызванное обработкой гомоцистеином [14].

Согласно некоторым данным, инфракрасное излучение с более короткой длиной волны (635 нм), чем использованное нами, действует через цитохром-*с*-оксидазу митохондрий, поглощающую в этой области. Высокие дозы облучения приводят к всплеску продукции супероксидного аниона в митохондриях и, в свою очередь, к проявлению цитотоксических эффектов [9]. Поэтому можно предположить, что H₂S, высвобождаемый при культивировании клеток в присутствии NaHS, может действовать как антиоксидант, блокируя негативные эффекты активных форм кислорода, образующихся при облучении.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-30030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. (2015) *Clin. Chim. Acta.* **439**, 212–218.
2. Cuevasanta E., Möller M.N., Alvarez B. (2017) Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 9–25.
3. Wallace J.L., Blackler R.W., Chan M.V., Da Silva G.J., Elsheikh W., Flannigan K.L., Gamaniek I., Manko A., Wang L., Motta J.P., Buret A.G. (2015) Anti-inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 398–410.
4. Polhemus D.J., Lefer D.J. (2014) Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **114**, 730–737.
5. Xie Y.H., Zhang N., Li L.F., Zhang Q.Z., Xie L.J., Jiang H., Li L.P., Hao N., Zhang J.X. (2014) Hydrogen sulfide reduces regional myocardial ischemia injury through protection of mitochondrial function. *Mol. Med. Rep.* **10**, 1907–1914.
6. Андреева Н.В., Зотов К.В., Егоров Е.Е., Калашникова М.В., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н., Белявский А.В. (2016) Воздействие инфракрасного лазерного облучения на размножение клеток меланомы человека в культуре. *Биофизика.* **61**, 1182–1189.
7. Андреева Н.В., Зотов К.В., Егоров Е.Е., Кандариков О.Ф., Юсупов В.И., Белявский А.В. (2018) Цитотоксическое действие низкоинтенсивного инфракрасного лазерного облучения на клетки меланомы человека. *Молекуляр. биология.* **52**, 1014–1028.
8. Passarella S., Karu T. (2014) Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **140**, 344–358.
9. Wu S., Zhou F., Wei Y., Chen W.R., Chen Q., Xing D. (2014) Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 733–746.
10. Szabo C., Ransy C., Módos K., Andriamihaja M., Murgheș B., Coletta C., Olah G., Yanagi K., Bouillaud F. (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2099–2122.
11. Nicholson R.A., Roth S.H., Zhang A., Zheng J., Brookes J., Skrajny B., Bennington R. (1998) Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **54**, 491–507.
12. Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 3481–3498.
13. Wen Y.D., Wang H., Kho S.H., Rinkiko S., Sheng X., Shen H.M., Zhu Y.Z. (2013) Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *PLoS One.* **8**, e53147.
14. Yan S.K., Chang T., Wang H., Wu L., Wang R., Meng Q.H. (2006) Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 485–491.

HYDROGEN SULFIDE DONOR NaHS PROTECTS MESENCHYMAL STEM AND MELANOMA CELLS FROM NEGATIVE EFFECTS OF INFRARED LASER IRRADIATION

N. V. Andreeva¹, K. V. Zotov², V. I. Yusupov², A. V. Belyavsky^{1,*}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of photon technologies, Federal Research Center of Crystallography and Photonics, Russian Academy of Sciences, Troitsk, Moscow, 108840 Russia

*e-mail: abelyavs@yahoo.com

We have established earlier that the 835 nm infrared laser irradiation results in a dose-dependent growth inhibition of human mesenchymal stem and melanoma cells, and is able to induce cell death of the latter. In the present work, we demonstrated that hydrogen sulfide donor NaHS is able to protect both cell types from the negative action of laser irradiation, and the magnitude of protection effect depends on NaHS concentration. The mechanism of cell protection by NaHS is primarily attributable to its effects on intracellular processes occurring after irradiation since the protective effect does not depend on whether NaHS is added before or after irradiation. Moreover, NaHS is able to exert its protective action even when added 6 hours post irradiation.

Keywords: hydrogen sulfide, infrared laser irradiation, melanoma, mesenchymal stem cells, cytotoxicity