

Антипролиферативный потенциал монооксида углерода

Старикова Е.Г.

Antiproliferative potential of carbon monoxide

Starikova Ye.G.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Старикова Е.Г.

В результате проведенного исследования было показано, что монооксид углерода обладает антипролиферативным потенциалом в отношении клеток линии Jurkat. Указанный газовый трансмиттер вызывает задержку клеток в G1-фазе клеточного цикла. Ингибирование p38-зависимых путей не влияет на СО-опосредованные изменения пролиферации опухолевых клеток линии Jurkat.

Ключевые слова: клеточный цикл, монооксид углерода, p38 MAP-киназа.

The investigation results showed carbon monoxide had antiproliferate potential in Jurkat cells. This gaseous transmitter led to delay of G1 phase of cell cycle. Inhibition of p38 MAPK-dependent pathways didn't influence on CO-mediated proliferation of Jurkat cells changes.

Key words: cell cycle, carbon monoxide, p38 MAP kinase.

УДК 576.36:576.385.5:612.111.14

Введение

Опухолевые клетки характеризуются коротким и неконтролируемым периодом пролиферации. Большинство онкогенных событий ведут к дисрегуляции клеточных процессов, ответственных за контроль клеточного цикла. Последний можно разделить на несколько стадий: G1-стадия (самая продолжительная стадия, в которой клетки подготавливаются к синтезу ДНК); S-период (необходим для репликации ДНК); G2-стадия (клетки подготавливаются к митозу) и М-фаза (представляет собой митотическое деление клеток) [4].

Исследования последних лет показали, что монооксид углерода, признанный вторым газовым посредником вслед за оксидом азота, вовлечен в регуляцию пролиферации клеток. Так, СО ингибирует экспрессию мРНК циклина А и блокирует Cdk2, тем самым вызывая остановку клеточного цикла гладкомышечных клеток в G1-фазе [5]. Индукция экспрессии HO-1 (фермент, ответственный за синтез СО) ограничивает пролиферацию гладкомышечных клеток за счет ингибирования семейства транскрипционных факторов E2F. Последние участвуют в позитивной регуляции генов, продукты которых вовлечены в прогрессию S-фазы клеточного цикла [3]. Интерес исследователей к различным ас-

пектам жизнедеятельности гладкомышечных клеток обусловлен способностью СО изменять сосудистый тонус. Антипролиферативный потенциал монооксида углерода, выявленный в результате данных исследований, может быть использован для управления клеточным циклом при опухолевой трансформации клеток.

Целью настоящей работы явилось определение роли монооксида углерода в регуляции прогрессии фаз клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat.

Материал и методы

В качестве материала исследования были использованы клетки линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), которые инкубировали при температуре 37 °С и 5% CO₂ в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», г. Санкт-Петербург), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, L-глутамин в концентрации 0,3 мг/мл, гентамицин в концентрации 100 мкг/мл. Донор монооксида углерода CORM-2 добавляли в среду инкубации клеток в конечной концентрации 50, 100 и 500 мкм. Оценивали распределение клеток по фазам клеточного цикла после 30 мин и 24 ч воздействия донора моно-

оксида углерода. В качестве контроля использовали интактные клетки линии Jurkat. Для определения вовлеченности р38 MAP-киназы (МАРК) в СО-опосредованную регуляцию клеточного цикла в инкубационную среду клеток добавляли 0,02 мкм ингибитора данной киназы SB203580 за 30 мин до аппликации CORM-2.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили с использованием программного пакета ModFit7 для проточной лазерной цитометрии (Fax Canto2 (Beckton Dickenson, США)). Для пермеабилзации и окрашивания клеток использовали набор CycleTestKit (BD Bioscience, США).

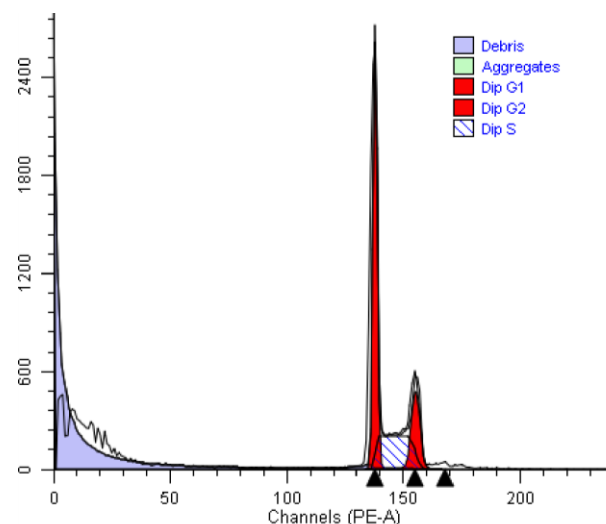
Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Достоверность различий ($p < 0,05$) оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены в виде медианы Me , верхнего и нижнего квартилей ($Q_1—Q_3$).

Результаты и обсуждение

При анализе клеточного цикла оценивается способность связывания ядерной ДНК с флуоресцентной меткой и последующий подсчет сигнала флуоресценции с помощью проточной цитометрии. Известно, что клетки в G1-фазу клеточного цикла имеют одну копию ДНК, и поэтому обладают 1X интенсивностью флуоресценции. Клетки в G2/M-фазе имеют в своем составе двухкопийную ДНК и, соответственно, 2X интенсивность. Таким образом, клетки в S-фазе синтеза ДНК обладают промежуточной флуоресценцией между 1X и 2X популяциями клеток (рисунок) [4].

При анализе распределения интактных клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла было продемонстрировано, что спустя 4 ч после пересева в G1-фазе клеточного цикла находились 63,93 (63,63—65,24)% клеток, в S 21,73 (19,24—22,90)% и 14,97 (14,48—15,55)% в G2. G1-фаза является критическим периодом клеточного цикла, когда позитивные и негативные сигналы могут вмешиваться в его регуляцию. Внеклеточные сигналы влияют на пролиферацию до прохождения клеткой точки рестрикции R, после которой клетка обречена на один раунд деления. Если клетка не получает митогенного стимула во время G1-фазы, она остается в фазе

покоя G0. Наличие клеток в S-фазе клеточного цикла позволяет сделать вывод о том, что клетки в культуре получают достаточное количество митогенных сигналов и проходят R-точку [1].



Распределение клеток по фазам клеточного цикла в интактной культуре линии Jurkat

Совместное культивирование клеток линии Jurkat с донором монооксида углерода CORM-2 в течение 4 ч сопровождалось увеличением количества клеток в G1-фазе цикла по сравнению с аналогичным значением в интактной культуре ($p < 0,05$). При этом наблюдалось уменьшение числа клеток в S-фазе клеточного цикла по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Количество клеток в G2-фазе не отличалось от такового в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием монооксида углерода увеличивается продолжительность G1-фазы клеточного цикла (таблица). Проверка правильности прогрессии клеточного цикла осуществляется в нескольких его точках, получивших название сверточных (checkpoint). Данные участки расположены в концах фаз G1, G2 и M. В первой точке осуществляется проверка наличия повреждений ДНК, во второй наряду с повреждениями ДНК проверяется завершенность репликации, в третьей тестируется правильность расхождения хромосом в митозе. Если обнаруживается какое-либо из вышеперечисленных нарушений, то происходит остановка клеточного цикла, что дает время для их исправления [4]. Полученные данные об увеличении числа клеток в G1-фазе при действии на них донора монооксида углерода свидетельствуют о том, что СО обладает генотоксиче-

ским эффектом, и задержка клеток в G1-фазе необхо-

дима для устранения полученных дефектов.

Таблица 1

Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла под воздействием монооксида углерода

Показатель	Количество клеток в G1-фазу клеточного цикла, %	Количество клеток в S-фазу клеточного цикла, %	Количество клеток в G2-фазу клеточного цикла, %
Интактные клетки, 4 ч	63,93 (62,63—65,24)	21,73 (19,24—22,90)	14,97 (14,48—15,55)
Воздействие CORM-2, 4 ч	67,28 (66,09—68,18) $p_1 < 0,05$	14,98 (14,93—15,00) $p_1 < 0,05$	16,95 (14,82—18,98) $p_1 > 0,05$
Интактные клетки, 24 ч	52,40 (52,15—52,48) $p_1 < 0,05$	28,96 (28,75—29,25) $p_1 < 0,05$	18,74 (18,61—18,77) $p_1 > 0,05$
Воздействие CORM-2, 24 ч	64,33 (62,27—68,66) $p_2 < 0,05$	15,39 (15,02—16,00) $p_2 < 0,05$	17,49 (15,00—19,34) $p_2 > 0,05$
Воздействие ингибитора р38 и CORM-2, 24 ч	59,93 (56,54—64,20) $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	16,08 (12,23—21,99) $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	21,47 (19,72—30,88) $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$

Примечание. p_1 — достоверность различий по сравнению с контролем после 4 ч инкубации; p_2 — достоверность различий по сравнению с контролем после 24 ч инкубации; p_3 — достоверность различий по сравнению с воздействием монооксида углерода после 24 ч инкубации.

После суток инкубации интактных клеток линии Jurkat в полной питательной среде 52,40 (52,15—52,48)% клеток остаются в G1-фазе клеточного цикла, 28,96 (28,75—29,25)% клеток вступают в фазу синтеза и 18,74 (18,61—18,77)% клеток готовы начать митоз. Сравнение указанных данных с аналогичными параметрами после 4 ч инкубации позволяет сделать вывод об укорочении G1-фазы клеточного цикла (таблица). Показано, что опухолевые клетки способны вырабатывать вещества, способствующие пролиферации [1]. Возможно, указанные ауто- и паракринные механизмы позволяют клеткам линии Jurkat укорачивать период G1-фазы.

Воздействие СО-высвобождающей молекулы на клетки линии Jurkat в течение 24 ч приводило к увеличению числа клеток в G1-фазе, их уменьшению в S-фазу по сравнению с аналогичными параметрами в контроле ($p < 0,05$). Количество клеток в G2-фазе клеточного цикла не отличалось от такового в интактных клетках линии Jurkat ($p > 0,05$). Таким образом, под влиянием монооксида углерода в клетках удлиняется G1-фаза. Задержка клеток в G1-фазе клеточного цикла свидетельствует об антипролиферативном влиянии СО.

Было показано, что часть внутриклеточных эффектов монооксида углерода опосредованы активацией р38 MAPK [2]. Последняя является стрессактивируемой киназой, поскольку ее индукция происходит в

результате воздействия на клетку различных стрессовых сигналов, приводящих к гибели. Данный факт положен в основу утверждения о том, что р38 опосредует клеточную смерть. Указанное утверждение верно в большинстве случаев, однако исследования причина — эффект выявили, что при некоторых условиях р38 ответственна за выживание клеток. р38 MAPK в качестве молекулы выживания активируется в условиях повреждения клеточной ДНК. В литературе имеются данные, указывающие на то, что р38 MAPK вовлечена в обеспечение выживаемости опухолевых клеток независимо от повреждения ДНК и способствует метастазированию опухолей. Данный эффект опосредован р38 MAPK за счет регуляции секреции факторов, вовлеченных в выживаемость и миграцию клеток. Так, базальная активация р38 MAPK в В-клетках хронической лимфоцитарной лейкемии ответственна за экспрессию MMP-9 металлопротеазы, которая необходима для выживания данных клеток при культивировании в присутствии стромальных клеток [6]. Снижение базального уровня и TGFβ1-индуцированной MMP-9 активности было обнаружено в клетках рака молочной железы при генетическом и фармакологическом ингибировании р38 MAPK, что приводило к угнетению метастазирования *in vivo* [7].

Совместное инкубирование клеток с CORM-2 и ингибитором р38 не приводило к изменению распределения клеток по фазам клеточного цикла (таблица). Полу-

ченные данные свидетельствуют о том, что используемая концентрация донора монооксида углерода является физиологичной для клеток и не приводит к индукции стрессактивируемой p38 MAPK.

Таким образом, монооксид углерода вызывает задержку клеток в G1-фазе клеточного цикла, данный эффект не зависит от p38 MAP-киназы.

Заключение

При выполнении данного исследования были получены результаты, свидетельствующие об антипролиферативном потенциале монооксида углерода в отношении опухолевых клеток линии Jurkat. Задержка клеток в G1-фазе под влиянием донора CO не зависела от p38 MAP-киназы.

Работа выполнена в рамках Федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы» (ГК № 16.512.11.2087) и «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» (ГК № П1311, ГК 14.740.11.0932).

Литература

1. *Evan G.I., Vousden K.H.* Proliferation, cell cycle and apoptosis // *Nature*. 2001. V. 411. P. 342—348.
2. *Gunther L., Berberat P.O., Haga M. et al.* Carbon monoxide protects pancreatic β -cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation // *Diabetes*. 2002. V. 51. P. 994—999.
3. *He S., Cook B.L., Deverman B.E. et al.* E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 363—372.
4. *Kasten M., Bartek J.* Cell cycle checkpoints and cancer // *Nature*. 2004. V. 432. P. 316—323.
5. *Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K.* Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme // *Trends Immunol.* 2003. V. 24. P. 449—455.
6. *Ringshausen I. et al.* Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells // *Leukemia*. 2004. V. 18. P. 1964—1968.
7. *Suarez-Cuervo C. et al.* Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice // *Clin. Exp. Metastasis*. 2004. V. 21. P. 525—526.

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Утверждена к печати 30.05.2012 г.

Сведения об авторах

Е.Г. Старикова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Старикова Елена Григорьевна, тел. 8-906-951-7897; e-mail: to-elen@yandex.ru