

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ГЛИОМЫ, ОПОСРЕДОВАННАЯ КОЭНЗИМОМ Q₁₀, ПРИ НЕДОСТАТКЕ СЫВОРОТКИ IN VITRO

© Н. Г. Крылова,¹ * Т. А. Кулагова,¹ С. В. Корень,² Г. Н. Семенкова¹

¹ Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь, и

² Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, 220114, Беларусь;

* электронный адрес: krylovang@bsu.by

Изучены механизмы влияния коэнзима Q₁₀ на пролиферацию клеток глиомы при культивировании в условиях истощения сыворотки, что моделирует рост опухоли в областях с недостатком питательных веществ. Показано, что добавление убихинона в среду культивирования приводит к увеличению жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, а также способствует восстановлению митохондриального потенциала и увеличению числа энергизированных митохондрий. Показано, что индуцированная коэнзимом Q₁₀ пролиферация клеток в условиях недостатка сыворотки обусловлена снижением концентрации внутриклеточного восстановленного глутатиона с последующей активацией протеинкиназ С, ERK1,2 и фосфоинозитол-3-киназы.

Ключевые слова: убихинон, глиома, пролиферация, редокс-состояние, редокс-регуляция

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, EGF — эпидермальный фактор роста, FBS — фетальная бычья сыворотка, GSH — восстановленный глутатион, H₂DCF-DA — диацетат 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина, MCB — моноклоробиман, PI3K — фосфоинозитол-3-киназа, PKC — протеинкиназа С, S1P — сфингозин-1-фосфат, SMPD — сфингомиелинфосфодиэстераза, SphK — сфингозинкиназа.

Коэнзим Q₁₀ (убихинон) является компонентом электрон-транспортной цепи митохондрий, обеспечивает перенос электронов и защищает мембранные структуры от повреждения активными формами кислорода (АФК) (Crane, 2000; Villalba, Navas, 2000). Установлено, что убихинон оказывает терапевтическое действие при нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваниях (Littarru, Tiano, 2010). В ряде исследований показано, что применение коэнзима Q₁₀ в качестве эффективного антиоксиданта при химиотерапии опухолей способствует снижению кардиотоксичности противоопухолевых препаратов (Conklin, 2005; Littarru, Tiano, 2010; Soni, 2015). С другой стороны, выявлено, что химиотерапевтические препараты, такие как камптотецин, эпопозид, доксорубин и метотрексат, индуцируют повышение концентрации коэнзима Q₁₀ в опухолевых клетках, что может способствовать повышению их выживаемости (Brea-Calvo et al., 2006). В одной из работ (Crane, 2000) убихинон рассматривается как редокс-регулятор клеточных функций благодаря его способности проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства, обеспечивающие продукцию пероксида водорода.

Рост опухоли сопровождается хаотической васкуляризацией, что приводит к неравномерному обеспечению кислородом и питательными веществами трансформированных клеток (Vaupel, 2004). Быстрорастущие опухоли характеризуются наличием областей с нарушенным кровоснабжением и значительными градиентами распре-

ления питательных веществ. Известно, что такая гетерогенность микроокружения опухолевых клеток является одним из факторов опухолевой прогрессии и обуславливает большую вариабельность их чувствительности к противоопухолевым препаратам. Ответ опухолевых клеток на действие биологически активных соединений может значительно варьировать в зависимости от их метаболического микроокружения. В связи с этим возникает необходимость проводить скрининг влияния различного рода соединений на функции опухолевых клеток в условиях, максимально приближенных к условиям в различных областях опухоли.

Известно, что в условиях недостатка факторов роста, в частности при отсутствии сыворотки в среде культивирования, убихинон препятствует развитию апоптоза в опухолевых клетках (López-Lluch et al., 1999; Navas et al., 2002) и усиливает пролиферативную активность фибробластов (BALB/3T3) и клеток лейкемии человека (K562 и HL-60) (Gómez-Díaz et al., 2000). Убихинон способен ингибировать сфингомиелинфосфодиэстеразу (SMPD) (КФ 3.1.4.12 нейтральная сфингомиелиназа), что предотвращает накопление церамида и как следствие препятствует апоптозу (Martin et al., 2003). Предполагают, что ингибирование SMPD может быть обусловлено как взаимодействием фермента с убихиноном, так и убихиноноопосредованным ингибированием перекисного окисления липидов (Navas et al., 2007). Механизмов передачи митогенного сигнала при действии убихинона не выявлено.

Для применения убихинона при терапии опухолей необходимо знать влияние коэнзима Q_{10} на функционирование опухолевых клеток в зависимости от их редокс-состояния и физико-химических параметров микроокружения. Целью настоящего исследования было оценить влияние коэнзима Q_{10} и выявить редоксзависимые механизмы влияния этого хинона на пролиферативную активность клеток глиомы в условиях недостатка сыворотки в среде культивирования. В данной работе используется модель роста опухолевых клеток в областях с недостатком питательных веществ, которую мы создаем посредством истощения сыворотки в среде культивирования.

Материал и методика

Реагенты и среды. В работе использовали: Тритон X-100, диацетат 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина ($H_2DCF-DA$), иодид пропидиума, монохлоробиман (МСВ), DL-бутионин-(S,R)-сульфоксимины (BSO), коэнзим Q_{10} , среду культивирования Игла в модификации Дульбекко (DMEM), диметилсульфоксид (ДМСО), дикумарол, ингибиторы PD098059, Sb203580, SP600125, Gö6983, LY294002 и JSH (Sigma, США); флуоресцентный зонд JC-1 (Life Technologies, США); гентамицин (ОАО Белмедпрепараты, Беларусь); фетальную бычью сыворотку (FBS) (HyClone, США); NaCl, KCl, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$ и глюкозу (Анализ-Х, Беларусь). Буферный раствор включал в себя (ммоль/л): 131.0 NaCl, 5.0 KCl, 1.3 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.3 $CaCl_2$, 6.0 глюкозы и 20 HEPES.

Клетки глиомы крысы линии С6, полученные из коллекции культур ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии (г. Минск), культивировали в среде Игла DMEM, содержащей 10 % FBS и $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл гентамицина, при 37 °С. Число клеток в 1 мл при пересеве составляло $1.0 \cdot 10^5$. На 2-е сут роста клеток (70—80 % конfluenceности монослоя) производили смену культуральной среды на DMEM с содержанием FBS 2 %. Затем клетки культивировали в течение 24 или 72 ч в присутствии ДМСО (не более 0.1 %) (контрольные образцы) или коэнзима Q_{10} в различных концентрациях. Коэнзим Q_{10} вносили в образцы в виде раствора в ДМСО.

Жизнеспособность и пролиферативную активность клеток глиомы оценивали флуоресцентным методом на спектрофлуориметре (СМ2200 «Солар», Беларусь) с использованием иодида пропидиума (PI) (Kato et al., 1999). После культивирования клеток в присутствии коэнзима Q_{10} и 2 % FBS в течение 24 или 72 ч монослой клеток дважды промывали буфером, после чего вносили PI в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Через 5 мин измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} (длины волн возбуждения и регистрации составляли соответственно 530 и 645 нм). Затем клетки разрушали с помощью 0.1%-ного Тритона X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции F_{t1} . Жизнеспособность клеток в каждом образце V определяли как отношение числа живых клеток к числу всех клеток в пробе по формуле

$$V = \frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где F_{d2} и F_{t2} — параметры интенсивности флуоресценции иодида пропидиума в отсутствие и в присутствии

Тритона X-100 соответственно в буферном растворе HEPES. Для удобства сравнения жизнеспособность для каждого образца V нормировали на жизнеспособность в контроле V_0 .

Пролиферативную активность N относительно контроля N_0 определяли по формуле

$$N/N_0 = \frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t10} - F_{t2}) - (F_{d10} - F_{d2})} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где F_{d10} и F_{t10} — параметры интенсивности флуоресценции F_{d1} и F_{t1} для контрольного образца.

Скорость утилизации пероксида водорода клетками оценивали на спектрофлуориметре (СМ2200 «Солар», Беларусь), используя флуоресцентный зонд диацетат 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина ($H_2DCF-DA$) (Wrona, Wardmann, 2006). В суспензию клеток вносили $H_2DCF-DA$ в конечной концентрации 1 мкмоль/л на 30 мин при 37 °С. После этого клетки отмывали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 7 мин и суспендировали в HEPES-буфере. Число клеток в пробе составляло 1 млн в 1 мл. Регистрировали кинетику изменения интенсивности флуоресценции зонда (длины волн возбуждения и регистрации соответственно 488 и 530 нм) непосредственно после добавления к клеткам свежеприготовленного раствора пероксида водорода ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий (ϕ) клеток глиомы проводили флуоресцентным методом с использованием зонда JC-1 (Smiley et al., 1991). Клетки культивировали с коэнзимом Q_{10} в концентрации 1 мкмоль/л в течение 20 мин или 24 ч при 37 °С. Затем монослой клеток дважды промывали буфером HEPES, после чего клетки инкубировали в том же буфере в течение 15 мин при 37 °С с 5 мкмоль/л JC-1. Регистрировали интенсивность флуоресценции при длинах волн 530 и 590 нм (возбуждение при 490 нм). Распределение интенсивностей флуоресценции JC-1 в клетках регистрировали с использованием конфокального сканирующего микро-Раман-спектрометра (Нанофайндер, Lotis, Беларусь—Япония) при возбуждении синим лазером с длиной волны 473 нм. Шаг сканирования составлял 1 мкм. Потенциал на митохондриальной мембране оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции (I) зонда в мономерной (при 530 нм) и димерной (при 590 нм) формах (I_{590}/I_{530}).

Концентрацию внутриклеточного восстановленного глутатиона (GSH) определяли с использованием монохлоробимана (МСВ). Суспензию клеток глиомы (1 млн/мл) инкубировали в буферном растворе, содержащем 10 мкмоль/л МСВ, в течение 30 мин при 37 °С. Регистрировали интенсивность флуоресценции глутатионил-конъюгатов МСВ (I^{mcb}) при возбуждении на длине волны 390 нм и регистрации при 480 нм. Результаты измерения представлены в работе как отношение концентраций в исследуемом образце ($[GSH]$) и контрольном ($[GSH]_0$), равное отношению интенсивностей флуоресценции МСВ для этих образцов (I^{mcb}/I_0^{mcb}).

Статистическая обработка результатов. Определяли среднюю величину для группы независимых измерений (более трех). Полученные данные представлены как среднее значение и произведение стандартного отклонения и коэффициента Стьюдента для соответствующего количества измерений (доверительная вероятность $P = 0.95$).

Таблица 1

Пролиферативная активность (N) и жизнеспособность (V) клеток глиомы через 24 ч воздействия коэнзима Q₁₀ в различных концентрациях

| [Коэнзим Q ₁₀], мкмоль/л | N | | V | |
|---|---|---------------------|---------|----------------------|
| | при концентрации сыворотки в среде культивирования, % | | | |
| | 10 | 2 | 10 | 2 |
| 0 | 100 ± 5 | 77 ± 5 | 100 ± 4 | 96 ± 4 |
| 0.1 | 105 ± 5 | 79 ± 5 | 98 ± 3 | 99 ± 5 |
| 1.0 | 96 ± 6 | 93 ± 6 ^a | 102 ± 4 | 103 ± 4 |
| 10.0 | 100 ± 3 | 92 ± 5 ^a | 99 ± 3 | 113 ± 6 ^b |
| 100.0 | 99 ± 6 | 76 ± 5 | 90 ± 4 | 115 ± 7 ^b |

Примечание. N и V нормированы на соответствующие значения в контрольных образцах, культивируемых в стандартных условиях с содержанием сыворотки 10 % в отсутствие коэнзима Q₁₀. Здесь и в табл. 2 статистически значимые изменения относительно образцов без хинона при ^aP < 0.01 и ^bP < 0.05.

Кинетические зависимости, приведенные в работе, являются типичными для серии из 3—5 независимых экспериментов.

Результаты

В табл. 1 представлены данные по влиянию коэнзима Q₁₀ на пролиферативную активность и выживаемость клеток глиомы, культивируемых в течение 24 ч в стандартных условиях (10 %) и при недостатке (2 %) сыворотки. Видно, что коэнзим Q₁₀ (убихинон) в пределах концентраций 1—10 мкмоль/л не оказывает влияния на пролиферативную активность и жизнеспособность клеток, культивируемых в среде, содержащей 10 % сыворотки. Недостаток сыворотки в среде (2 %) не влияет на жизнеспособность клеток и приводит к снижению пролиферативной активности в отсутствие убихинона на 23 ± 5 %. В то же время присутствие 1 или 10 мкмоль/л убихинона в среде культивирования, содержащей 2 % сыворотки, вызывает увеличение пролиферативной активности клеток на 16 ± 6 %. При концентрации коэнзима Q₁₀ 0.1 или 100 мкмоль/л усиления пролиферации не наблюдали. Примечательно, что жизнеспособность клеток, культивируемых в условиях недостатка сыворотки, дозозависимо повышается с увеличением концентрации убихинона. Следует отметить, что при более длительном (72 ч) культивировании клеток в среде, содержащей 2 % сыворотки и 1 мкмоль/л коэнзима Q₁₀, наблюдается увеличение пролиферативной активности на 40 ± 7 %. Из полученных данных следует, что коэнзим Q₁₀ может индуцировать пролиферацию и повышать выживаемость клеток глиомы при недостатке сыворотки в среде культивирования.

На рис. 1 представлены типичные изображения распределения флуоресцентного зонда JC-1 в клетках глиомы С6 после воздействия коэнзима Q₁₀ в концентрации 1 мкмоль/л в течение 20 мин и 24 ч. Известно, что JC-1 (эмиссия при 530 нм) эффективно накапливается в энергизированных митохондриях с образованием димеров (эмиссия при 590 нм) (Smiley et al., 1991). Соотношение интенсивностей флуоресценции зонда в мономерной и димерной формах I₅₉₀/I₅₃₀ отражает потенциал на митохондриальной мембране. Из сравнения рис. 1, I, д и 1, I, ж видно, что митохондриальный потенциал в клетках не изменяется непосредственно после добавления убихино-

на. В то же время регистрируется снижение митохондриального потенциала и числа функционирующих митохондрий при культивировании клеток в течение 24 ч в условиях недостатка сыворотки (рис. 1, I (e), II). Наличие убихинона в среде культивирования способствует поддержанию митохондриального потенциала клеток и приводит к значительному увеличению числа функционирующих митохондрий (рис. 1, I (z, u), II).

С целью выявления роли редокс-процессов в коэнзим Q₁₀-индуцированной пролиферации клеток С6 в условиях недостатка сыворотки нами изучено влияние убихинона на внутриклеточное содержание GSH, одного из основных низкомолекулярных антиоксидантов. Установлено, что при культивировании клеток в течение 24 ч в присутствии 1 мкмоль/л коэнзима Q₁₀ уровень GSH снижается на 15 ± 5 %.

Редокс-превращения хинонов в клетках обусловлены процессами их ферментативного одно- и двухэлектронного восстановления. Одноэлектронное восстановление хинонов до семихинонов может приводить к генерации супероксидного анион-радикала вследствие автоокисления последних. С другой стороны, двухэлектронное восстановление коэнзима Q₁₀ до убихинола препятствует образованию убисемихинона. Известно, что убихинол обладает антиоксидантным действием (Bentinger et al., 2007). Двухэлектронное восстановление коэнзима Q₁₀ в плазматической мембране может катализироваться NADH-хинон оксидоредуктазой 1 (ДТ-диафороза, NQO1) (Navarro et al., 1995; De Cabo et al., 2004), липоамиддегидрогеназой, тиоредоксинредуктазой и глутатионредуктазой (Nordman et al., 2003). ДТ-диафороза рассматривается как основной фермент, катализирующий восстановление убихинона до убихинола во внемитохондриальной фракции (Navarro et al., 1995; De Cabo et al., 2004).

Нами показано, что при культивировании клеток в течение 24 ч в условиях ингибирования ДТ-диафоразы дикумаролом концентрация GSH снижается на 22 ± 5 % относительно контроля. Это, вероятно, обусловлено тем, что в отсутствие двухэлектронного восстановления коэнзим Q₁₀ эффективнее переходит в убисемихинон, в результате чего повышается выход АФК, что может приводить к снижению пула GSH.

Зарегистрированное нами снижение концентрации GSH при экзогенном воздействии коэнзима Q₁₀ может быть обусловлено смещением химического равновесия

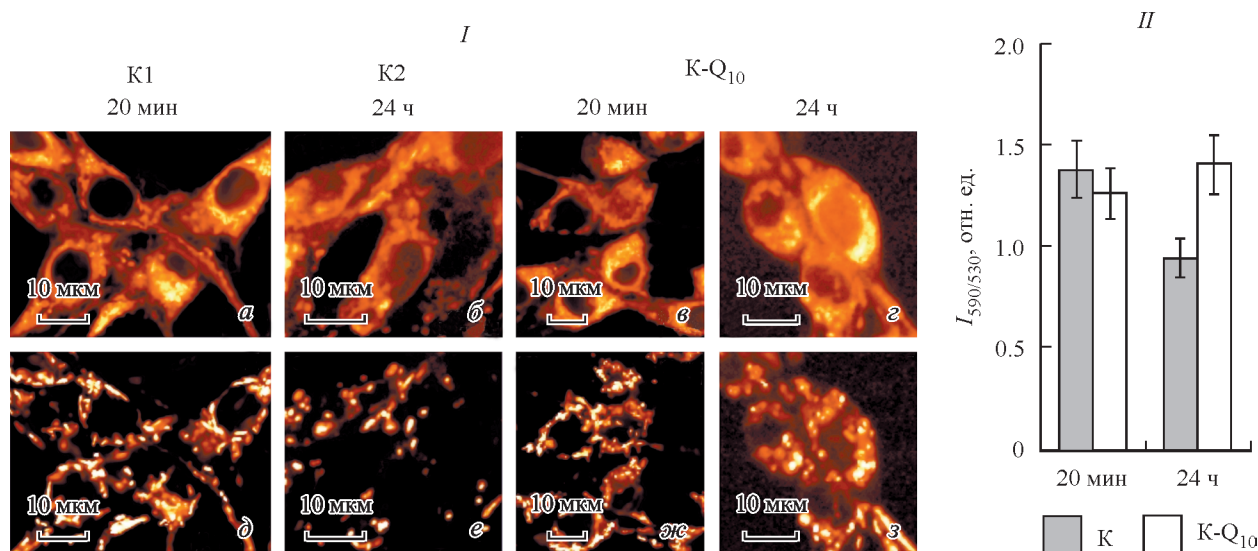


Рис. 1. Распределение флуоресцентного зонда JC-1 в клетках глиомы С6 (I), а также их митохондриальный потенциал (II) при действии коэнзима Q₁₀ (K-Q₁₀, 1 мкмоль/л) в условиях недостатка сыворотки (2 %).

I — типичные флуоресцентные конфокальные изображения: а—д — флуоресценция JC-1 в мономерной форме (при 530 нм); е—з — флуоресценция JC-1 в димерной форме (при 590 нм); а, в, д, ж — стандартные условия культивирования в отсутствие K-Q₁₀ (а, д — контроль K1) и в присутствии K-Q₁₀ в течение 20 мин (в, ж); б, е, г, з — 24 ч культивирования при недостатке сыворотки в отсутствие K-Q₁₀ (б, е — K2) и в присутствии K-Q₁₀ (г, з). II — митохондриальный потенциал выражен отношением интенсивностей зонда JC-1 на длинах волн испускания 590 и 530 в контроле (К) и при действии K-Q₁₀ в течение 20 мин и 24 ч в условиях недостатка сыворотки.

процессов одно- и двухэлектронного восстановления в сторону образования семиубихинона, что сопровождается дополнительной генерацией АФК и уменьшением уровня GSH в клетках. С другой стороны, известно, что коэнзим Q₁₀ конкурирует с GSH за места связывания в активном центре глутатионредуктазы, и это также может вызывать снижение концентрации GSH (Nordman et al., 2003).

Редокс-состояние клеток можно оценить по скорости утилизации экзогенного пероксида водорода (Makino, 1994; Крылова, 2008). На рис. 2 представлены типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции клеток глиомы, нагруженных АФК-зависимым зондом H₂DCF-DA, при добавлении к клеткам 50 мкмоль/л H₂O₂.

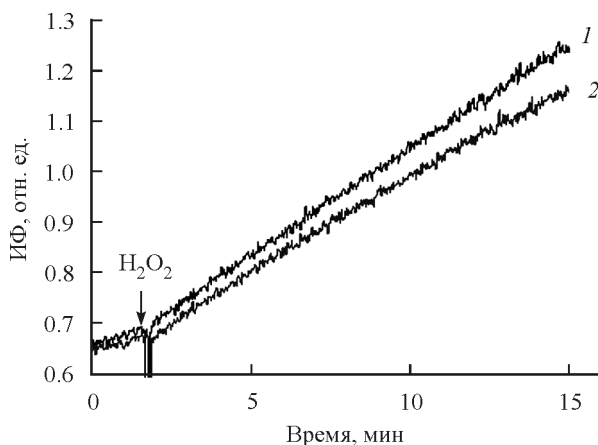


Рис. 2. Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток глиомы крысы, нагруженных зондом H₂DCF-DA, при действии 50 мкмоль/л пероксида водорода при культивировании в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 1 мкмоль/л коэнзима Q₁₀ в условиях 24-часового недостатка сыворотки.

Проникая в клетку, H₂O₂, с одной стороны, может окислять зонд, что будет приводить к повышению интенсивности флуоресценции. С другой стороны, утилизация H₂O₂ антиоксидантной системой клеток вызывает постепенное снижение скорости окисления зонда. Из этого следует, что повышение антиоксидантного статуса клеток будет приводить к снижению интенсивности флуоресценции зонда, наблюдаемой при добавлении экзогенного H₂O₂. Как видно на рис. 2, для клеток глиомы, культивируемых с убихиноном в течение 24 ч, интенсивность флуоресценции при экзогенном воздействии H₂O₂ ниже, чем для клеток в контрольных образцах. Это свидетельствует о более высокой скорости утилизации экзогенного H₂O₂ клетками после обработки убихиноном. Таким образом, убихинон способствует повышению внутриклеточного антиоксидантного статуса клеток С6 при культивировании в условиях недостатка сыворотки.

Мы установили, что при действии дикумарола (ингибитора NQO1) число клеток, культивируемых при недостатке сыворотки, уменьшается на 35 ± 7 %. При этом культивирование клеток глиомы в присутствии убихинона и дикумарола не оказывает влияния на пролиферативную активность (ее значение составляет 111 ± 11 %; табл. 2). Из этого следует, что восстановление убихинона до убихинола является необходимым этапом активации клеточной пролиферации.

Известно, что окисление хинола до семихинона и хинона приводит к образованию АФК и активации редокс-зависимых факторов, участвующих в адапционном отклике клеток на окислительный стресс и приводящих к накоплению антиоксидантов. С использованием специфического ингибитора JSH мы оценили участие ядерного фактора Nf-κB в регуляции пролиферации клеток глиомы. Выявили снижение числа клеток относительно контроля на 36 ± 5 % при действии JSH в условиях недостатка сыворотки. Добавление коэнзима Q₁₀ в среду культивирования на фоне ингибирования Nf-κB, так же как и в

Т а б л и ц а 2

Пролиферативная активность клеток глиомы при ингибировании различных сигнальных путей при действии 1 мкмоль/л коэнзима Q₁₀ в течение 72 ч в условиях недостатка сыворотки

| Мишень воздействия | Ингибитор | Пролиферативная активность, % | | |
|--------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | | контроль | коэнзим Q ₁₀ (1 мкмоль/л) | |
| | | N _i /N ₀ | N _Q /N ₀ | N _Q /N _i |
| — | — | 100 ± 5 | 140 ± 10 | 140 ± 10 |
| NQO1 | Дикумарол | 65 ± 7 | 72 ± 5 | 111 ± 11 ^б |
| Nf-κB | JSH | 64 ± 5 | 86 ± 5 | 135 ± 9 |
| PKC | Gδ6983 | 97 ± 7 | 93 ± 10 | 97 ± 11 ^а |
| PI3K | LY294002 | 92 ± 10 | 90 ± 7 | 97 ± 11 ^а |
| ERK1/2 | PD098059 | 72 ± 9 | 70 ± 6 | 96 ± 12 ^а |
| p38 | Sb203580 | 67 ± 5 | 80 ± 6 | 120 ± 7 ^а |
| JNK | SP600125 | 52 ± 5 | 68 ± 5 | 131 ± 10 |

Примечание. N₀ — пролиферативная активность клеток в контроле в отсутствие коэнзима Q₁₀ и ингибиторов; N_i — пролиферативная активность клеток в отсутствие коэнзима Q₁₀ при действии соответствующего ингибитора; N_Q — пролиферативная активность клеток при действии коэнзима Q₁₀ и в присутствии соответствующего ингибитора.

отсутствие ингибитора, повышало пролиферативную активность клеток глиомы на 35 ± 9 % относительно клеток, культивируемых без хинона. Следовательно, Nf-κB не активируется в процессе убихиноопосредованной пролиферации клеток при недостатке FBS.

Среди регулирующих пролиферацию белков, активация которых ассоциирована с изменением редокс-состояния клеток, можно выделить протеинкиназу C (PKC), митогенактивируемые протеинкиназы — ERK1/2, p38 и JNK, а также фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) (Trachootham et al., 2008). В условиях недостатка сыворотки пролиферативная активность клеток глиомы не зависит от PKC и PI3K, но снижается при ингибировании ERK1/2, p38 и JNK (табл. 2). При сочетанном действии коэнзима Q₁₀ и ингибитора ERK1/2, PKC или PI3K не наблюдается убихининдуцированного усиления пролиферативной активности клеток (ее значение составляет 96—97 %; табл. 2). Это свидетельствует об участии ERK1/2, PKC и PI3K в трансдукции стимулирующего к пролиферации сигнала с участием коэнзима Q₁₀ в клетках в условиях недостатка сыворотки.

На фоне ингибирования p38 и JNK при воздействии коэнзима Q₁₀ регистрируется усиление пролиферативной активности клеток. Однако если относительный прирост числа клеток в контроле (в отсутствие ингибиторов и в присутствии коэнзима Q₁₀) составлял 40 ± 10 %, то при ингибировании p38 он составляет 20 ± 7 %, а при ингибировании JNK — 31 ± 10 % (табл. 2). Таким образом, киназы p38 и JNK вносят незначительный вклад в коэнзим Q₁₀-опосредованную выживаемость и (или) пролиферацию клеток.

Обсуждение

При культивировании клеток в условиях недостатка сыворотки нами зарегистрировано снижение их митохондриального потенциала, что является одним из характерных признаков запуска апоптоза либо перехода клеток в фазу покоя G₀. Мы показали, что воздействие коэнзима Q₁₀ приводит к восстановлению митохондриального по-

тениала, значительно увеличивает число функционирующих митохондрий, повышает жизнеспособность и усиливает пролиферативную активность клеток глиомы. Таким образом, коэнзим Q₁₀ препятствует запуску апоптоза и (или) выходу клеток в фазу покоя.

За счет высокой гидрофобности коэнзим Q₁₀ плохо перераспределяется в клетке и накапливается преимущественно в плазматической мембране. Поэтому вероятными мишенями действия коэнзима являются ферменты, локализованные в плазматической мембране и вблизи нее. Известно, что в условиях отсутствия питательных веществ развитие апоптоза в клетках происходит с накоплением церамида и последующей митохондриальной дисфункцией (Ueda, 2015). В ряде работ было показано, что убихинон, ингибируя SMPD, препятствует развитию церамидиндуцированного апоптоза и стимулирует рост клеток в условиях отсутствия сыворотки (López-Lluch et al., 1999; Gómez-Díaz et al., 2000; Navas et al., 2002). Механизмами ингибирующего действия убихинона предположительно могут быть как прямое взаимодействие с ферментом, так и индуцированное коэнзимом Q₁₀ изменение редокс-состояния клеток и ингибирование перекисного окисления липидов (Martín et al., 2003; Navas et al., 2007). Показано, что восстановленный коэнзим Q₁₀ в диапазоне концентраций 10—100 мкмоль/л является эффективным неконкурентным ингибитором SMPD в плазматической мембране, в то время как коэнзим Q₁₀ в окисленной форме ингибирует SMPD значительно слабее: в концентрации 10 мкмоль/л степень ингибирования SMPD составляла не более 20 % (Martín et al., 2001). При этом активность фермента снижается с увеличением концентрации убихинона. Нами выявлено, что жизнеспособность клеток, культивируемых в условиях недостатка сыворотки, монотонно повышается с ростом концентрации коэнзима Q₁₀, а двухэлектронное восстановление убихинона до убихинола является необходимым этапом активации клеточной пролиферации. Эти данные позволяют предположить, что ингибирование убихинолом SMPD является механизмом, препятствующим запуску апоптоза в клетках глиомы и индуцирующим пролиферацию клеток в условиях недостатка сыворотки.

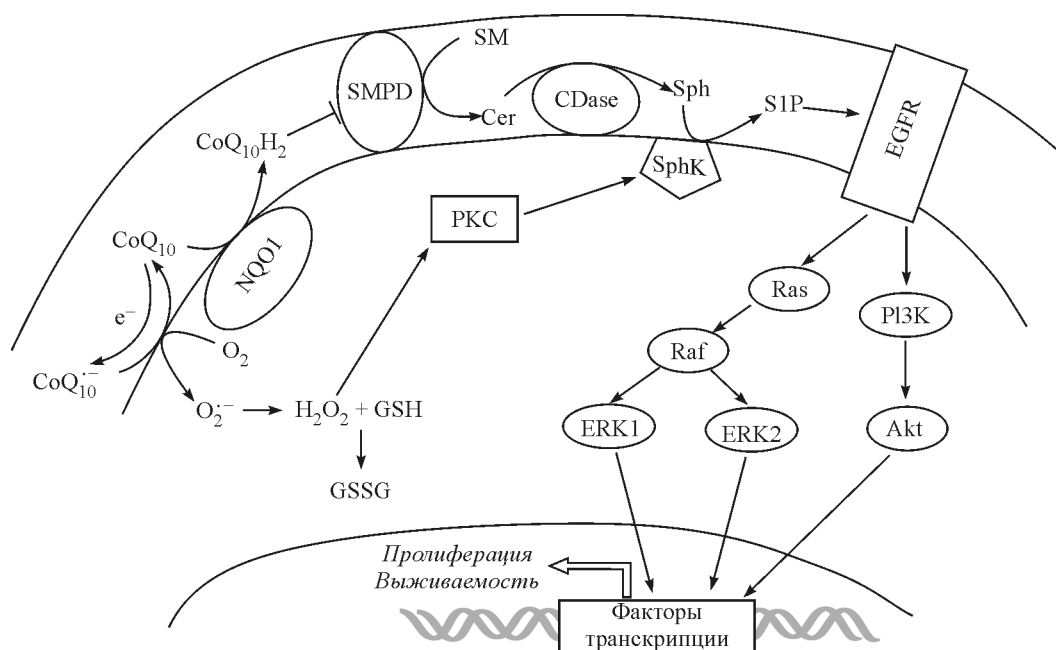


Рис. 3. Схема механизмов регуляции коэнзимом Q₁₀ пролиферации и жизнеспособности клеток глиомы в условиях недостатка (2 %) сыворотки.

Коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀) восстанавливается NAD(P)H:хинон оксидоредуктазой I (NQO1) до убихинола (CoQ₁₀H₂), который ингибирует нейтральную сфингомиелиназу (SMPD), что препятствует накоплению церамида (Cer) и тем самым обеспечивает жизнеспособность клеток в условиях недостатка сыворотки. Воздействие коэнзима Q₁₀ может приводить к смещению химического равновесия процессов одно- и двухэлектронного восстановления в сторону образования семиубихинона (CoQ₁₀^{•-}), что сопровождается дополнительным образованием H₂O₂, уменьшением уровня восстановленного глутатиона (GSH) и активацией протеинкиназы C (PKC). PKC в свою очередь активирует сфингокиназу (SphK) и приводит к накоплению сфингозин-1-фосфата (S1P). S1P индуцирует трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с последующей активацией сигнальных каскадов Ras/Raf/MEK/ERK1/2 и PI3K/Akt, вследствие чего усиливается пролиферативная активность клеток и повышается их выживаемость в условиях недостатка сыворотки. CDase — церамидаза, GSSG — глутатион окисленный, SM — сфингомиелин, Sph — сфингозин, PI3K — фосфоинозитол-3-киназа.

В то же время в отличие от жизнеспособности коэнзим Q₁₀-индуцированная пролиферативная активность клеток глиомы не увеличивается монотонно с ростом концентрации хинона, а изменяется в ограниченном диапазоне концентраций (1—10 мкмоль/л), что свидетельствует о наличии дополнительных механизмов убихинон-индуцированной активации клеточного роста.

Известно, что различные сигнальные пути активации (ингибирования) пролиферации клеток являются редокс-зависимыми. Нами выявлено, что воздействие коэнзима Q₁₀ приводит, с одной стороны, к повышению антиоксидантного статуса клеток (повышается скорость утилизации пероксида водорода), но, с другой стороны, снижается пул восстановленного глутатиона (при культивировании в течение 24 ч). Так как внутриклеточная редокс-сигнализация основана на модификации сульфгидрильных групп ряда редокс-чувствительных белков, выявленное нами снижение пула GSH, несмотря на общий повышенный антиоксидантный статус клеток, может приводить к повышению чувствительности редокс-активных участников сигнальных путей и возможности их активации даже в условиях низкого уровня окислителей. Кроме того, было установлено, что глутатион способен ингибировать SMPD, причем окисленный глутатион является в 3 раза более эффективным ингибитором SMPD, чем восстановленный (Liu, Hannun, 1997). Следует отметить, что экзогенный окисленный глутатион активирует рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) (Бурова и др., 2005).

Показано, что воздействие коэнзима Q₁₀ в концентрации 50 мкмоль/л на клетки CaCo-2 повышает экспрессию

79 генов, кодирующих сигнальные белки, в том числе PKCε, что подтверждает регуляторную роль коэнзима Q₁₀ в клетках (Groneberg et al., 2005). Мы установили, что PKC, ERK1/2 и PI3K вовлечены в усиление пролиферации клеток глиомы при действии коэнзима Q₁₀. Обнаружено (Mansat et al., 1997), что активация PKC препятствует образованию церамидов и церамидопосредованному апоптозу. Кроме того, PKC может активировать сфингокиназу (SphK) и транслоцировать ее из цитозоля к мембране (Johnson et al., 2002). Активация SphK в свою очередь стимулирует метаболизм сфинголипидов с накоплением сфингозин-1-фосфата (S1P), который способен усиливать пролиферацию клеток посредством активации рецептора EGF, запускающего сигнальные пути Ras/Raf/MEK/ERK1/2 (Kim et al., 2000) и PI3K/Akt (Wang, 2012). Следовательно, можно предположить, что PKC-опосредованная активация сигнальных путей SphK/EGF/Ras/Raf/MEK/ERK1/2 и PI3K/Akt является одним из механизмов действия убихинона на клетки глиомы в условиях недостатка сыворотки.

Стрессактивируемые киназы p38 и JNK преимущественно активируются для запуска апоптоза (Davis, 2000; Wada, Penninger, 2004), в том числе ассоциированного с накоплением церамида (Chen et al., 2008). Однако все больше исследований демонстрируют участие этих киназ в активации пролиферации и выживаемости опухолевых клеток и, следовательно, в развитии опухоли (Davis, 2000; Du et al., 2004; Thornton, Rincon, 2009). Например, показано (Du et al., 2004), что активация киназы JNK2 ускоряет пролиферацию клеток KB-3 за счет сокращения времени перехода из S-фазы в фазы G₂/M клеточного

цикла. Зарегистрированное нами ингибирование роста клеток при ингибировании киназ p38 и JNK свидетельствует о том, что эти киназы способствуют выживаемости опухолевых клеток при их длительном культивировании в условиях истощения сыворотки.

На основании полученных в работе результатов и данных литературы можно предположить следующий механизм действия коэнзима Q₁₀ на клетки, культивируемые в условиях недостатка питательных веществ (рис. 3). Восстановленный до убихинола коэнзим Q₁₀ ингибирует SMPD и приводит к снижению пула GSH с последующей активацией PKC и PKC-опосредованной активацией SphK, что приводит к накоплению сфингозин-1-фосфата (S1P) и препятствует образованию церамида. Отсутствие церамида обеспечивает жизнеспособность клеток и высокий уровень функциональной активности митохондрий в условиях истощения сыворотки, препятствуя тем самым запуску апоптотических путей. S1P индуцирует трансактивацию EGFR с последующей активацией сигнальных каскадов Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 и PI3K/Akt, что приводит к усилению пролиферации клеток и повышению их выживаемости в условиях истощения сыворотки.

Заключение. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что воздействие убихинона на клетки глиомы может способствовать выживаемости и усиливать пролиферацию опухолевых клеток в областях с недостатком питательных веществ.

Список литературы

Бурова Е. Б., Василенко К. П., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2005. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом глутоксим в клетках A431. Докл. РАН. 404 (1): 122—124. (Burova E. B., Vasilenko K. P., Antonov V. G., Nikol'skii N. N. 2005. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim in A431 cells. Doklady Biol. Sci. (Russian). 404: 392—394.)

Крылова Н. Г. 2008. Мониторинг редокс-свойств эритроцитов с использованием 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина. В кн.: Молодежь в науке — 2007: прил. к журн. Весці НАН Беларусі. 4 (3): 22—26. Минск: Беларус. наука. 462 с. (Krylova N. G. 2008. Monitoring of erythrocyte redox-properties with use of 2,7-dichlorofluorescein. In: Young people in science—2007: suppl. to Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. 4 (3): 22—26. Minsk: Belarus. Sci. 462 p.)

Bentinger M., Brismar K., Dallner G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion. 7S: 41—50.

Brea-Calvo G., Rodríguez-Hernandez Á., Fernández-Ayala D. J. M., Navas P., Sánchez-Alcázar J. A. 2006. Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q₁₀ levels in cancer cell lines. Free Rad. Biol. Med. 40: 1293—1302.

Chen C. L., Lin C. F., Chang W. T., Huang W. C., Teng C. F., Lin Y. S. 2008. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. Blood. 111: 4365—4374.

Conklin K. A. 2005. Coenzyme Q₁₀ for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. Integr. Cancer Ther. 4: 110—130.

Crane F. L. 2000. New functions for coenzyme Q. Protoplasma. 213: 127—133.

Davis R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP Kinases. Cell. 103: 239—252.

De Cabo R., Cabello R., Rios M., Lopez-Lluch G., Ingram D. K., Lane M. A., Navas P. 2004. Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. Exp. Gerontol. 39: 297—304.

Du L., Lyle C. S., Obey T. B., Gaarde W. A., Muir J. A., Bennett B. L., Chambers T. C. 2004. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity. Evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. J. Biol. Chem. 279: 11 957—11 966.

Gómez-Díaz C., Barroso M. P., Navas P. 2000. Plasma membrane coenzyme Q₁₀ and growth control. Protoplasma. 214: 19—23.

Groneberg D. A., Kindermann B., Althammer M., Klapper M., Vormann J., Littarru G. P., Doring F. 2005. Coenzyme Q₁₀ affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo—2 cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37: 1208—1218.

Johnson K. R., Becker K. P., Facchinetti M. M., Hannun Y. A., Obeid L. M. 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 277: 35 257—35 262.

Kato F., Tanaka M., Nakamura K. 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicol. In Vitro. 13: 923—929.

Kim J. H., Kim J. H., Song W. K., Kim J. H., Chun J. S. 2000. Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in Rat-2 cells. Life. 50: 119—124.

Littarru P., Tiano L. 2010. Clinical aspects of coenzyme Q₁₀: an update. Nutrition. 26: 250—254.

Liu B., Hannun Y. A. 1997. Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. J. Biol. Chem. 272: 6281—6287.

López-Lluch G., Barroso M. P., Martín S. F., Fernández-Ayala D. J. M., Gómez-Díaz C., Villalba J. M., Navas P. 1999. Role of plasma membrane coenzyme Q on the regulation of apoptosis. BioFactors. 9: 171—177.

Makino N., Mochizuki Y., Bannai S., Sugita Y. 1994. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. J. Biol. Chem. 269: 1020—1025.

Mansat V., Laurent G., Levade T., Bettaieb A., Jaffrezou J.-P. 1997. The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. Cancer Res. 57: 5300—5304.

Martín S. F., Gómez-Díaz C., Bello R. I., Navas P., Villalba J. M. 2003. Inhibition of neutral Mg²⁺-dependent sphingomyelinase by ubiquinol-mediated plasma membrane electron transport. Protoplasma. 221: 109—116.

Martín S. F., Navarro F., Forthoffer N., Navas P., Villalba J. M. 2001. Neutral magnesium-dependent sphingomyelinase from liver plasma membrane: purification and inhibition by ubiquinol. J. Bioenerg. Biomembr. 33: 143—153.

Navarro F., Villalba J. M., Crane F. L., McKellar W. C., Navas P. 1995. A phospholipid-dependent NADH-Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 138—143.

Navas P., Fernández-Ayala D. J. M., Martín S. F., López-Lluch G., de Cabo R., Rodríguez-Aguilera J. C., Villalba J. M. 2002. Ceramide-dependent Caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells. Free Rad. Res. 364: 369—374.

Navas P., Villalba J. M., de Cabo R. 2007. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. Mitochondrion. 7S: 34—40.

Nordman T., Xia L., Björkhem-Bergman L., Damdimopoulos A., Nalvarte I., Arnér E. S., Spyrou G., Eriksson L. C., Björnstedt M., Olsson J. M. 2003. Regeneration of the antioxidant ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase. BioFactors. 18: 45—50.

Smiley S. T., Reers M., Mottola-Hartshorn C., Lin M., Chen A., Smith T. W., Steele G. D., Chen L. B. 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88: 3671—3675.

Soni A., Verma M., Aggarwal S., Kaushal V., Verma Y. 2015. Role of coenzyme Q₁₀ in current oncology practice: substance or shadow! OncoExpert. 1: 14—22.

Thornton T. M., Rincon M. 2009. Non-Classical p38 MAP Kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* 5 : 44—52.

Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A., Rivera-del Valle N., Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10 : 1343—1374.

Ueda N. 2015. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *Int. J. Mol. Sci.* 16 : 5076—5124.

Vaupel P. 2004. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 14 : 198—206.

Villalba J. M., Navas P. 2000. Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 2 : 213—230.

Wada T., Penninger J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 23 : 2838—2849.

Wang Z. 2012. Mutual regulation of receptor-mediated cell signalling and endocytosis: EGF receptor system as an example. In: *Molecular regulation of endocytosis.* Rijeka: InTech Publisher. 301—330.

Wrona M., Wardmann P. 2006. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 41 : 657—667.

Поступила 1 IX 2016

GLIOMA CELL PROLIFERATION MEDIATED BY COENZYME Q₁₀
AT SERUM DEPRIVATION *IN VITRO*

N. G. Krylova,^{1,*} T. A. Kulahova,¹ S. V. Koren,² G. N. Semenkova¹

¹ Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus, and

² The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, 220114, Belarus;

* e-mail: krylovang@bsu.by

Mechanisms of coenzyme Q₁₀ effect on serum-deprived glioma cell proliferation have been studied. Our results have shown that the addition of coenzyme Q₁₀ into serum-free culture medium leads to increase in cell viability, stimulation of cell growth, as well as restoration of mitochondrial potential and increase of quantity of energized mitochondria. It has been found out that coenzyme Q₁₀-induced glioma cell proliferation under serum deficiency is a result of intracellular reduced glutathione concentration decrease with subsequent activation of protein kinase C, ERK1/2 and phosphoinositol-3-kinase.

Key words: ubiquinone, glioma, proliferation, redox state, redox regulation