

## ИНДУКЦИЯ ПРОГРАММЫ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ ИНГИБИТОРОМ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ БУТИРАТОМ НАТРИЯ В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ КРЫСЫ

© Ю. Г. Зубова, Т. В. Быкова, С. Г. Зубова, М. В. Абрамова, Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: [jul\\_zubova@mail333.com](mailto:jul_zubova@mail333.com)

Исследована возможность индукции программы ускоренного старения в эмбриональных фибробластах крысы и трансформантах, полученных из них переносом онкогенов *E1A* и *cHa-ras*. Обнаружено, что после воздействия ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия как нормальные, так и трансформированные клетки полностью прекращают пролиферацию и накапливаются на границах фаз G<sub>1</sub>/S и G<sub>2</sub>/M клеточного цикла. Данные по эффективности клонирования обработанных ингибитором клеток свидетельствуют о том, что блок клеточного цикла, индуцированный бутиратом натрия, является необратимым. Необратимость блока в трансформантах коррелирует по времени с накоплением активной фосфорилированной формы стресс-киназы p38 и выявлением маркера старения — β-галактозидазной активности, ассоциированной со старением (SA β-Gal). Таким образом, необратимое прекращение пролиферации в трансформантах E1A + cHa-ras можно рассматривать как пример активации антиканцерогенной программы по типу ускоренного старения в опухолевых клетках грызунов.

Ключевые слова: трансформация, старение, клеточный цикл, ингибитор гистоновых деацетилаз.

Принятые сокращения: HDACI — ингибитор гистоновых деацетилаз, NaB — бутират натрия, REF — эмбриональные фибробласты крысы, SA β-Gal — ассоциированная со старением β-галактозидаза.

Нормальные соматические клетки млекопитающих не могут делиться бесконечно долго. За ограничение числа делений клеток отвечает программа клеточного старения. Такая программа включает полную и необратимую остановку пролиферации на фоне сохранения высокой метаболической активности клетки. В стареющих клетках наблюдаются морфологические изменения: они становятся более крупными, плоскими и имеют большее количество лизосом (Roninson, 2003).

Много лет назад методом гибридизации соматических клеток было показано, что программа старения реализуется как генетически доминантная программа (Рингерц, Севидж, 1979). Исторически термин «старение» применительно к клетке был введен в связи с открытием «репликативного старения», которое было выявлено при длительном пассировании нормальных клеток человека в культуре (Hayflick, 1965). Было обнаружено последовательное укорочение теломер при каждом клеточном делении (Bodnar et al., 1998). Кроме того, оказалось, что независимо от укорочения теломер клетки быстро стареют при повышенной экспрессии онкогенов или после различного рода стрессовых воздействий (Mathon, Lloyd, 2001). Такой тип старения клеток получил название «ускоренное старение» (Roninson, 2003).

Несмотря на то, что хромосомы грызунов имеют очень длинные теломеры и высокую теломеразную ак-

тивность, процесс старения в них также идет. При этом ускоренное старение нельзя отменить повышенной экспрессией теломеразы (Wei, Sedivy, 1999). Таким образом, старение клеток и прекращение пролиферации могут быть не только следствием существования «митотических часов» в клетке, зависящих от длины теломер, но и следствием существования других механизмов, отвечающих за ограничение числа делений нормальной клетки. В частности, показано, что процессы ускоренного старения могут индуцировать мутантные формы онкогенов Ras и Raf-1, которые являются компонентами митоген-активируемого протеинкиназного каскада (Serrano et al., 1997; Zhu et al., 1998). Ростовые факторы, экспрессия онкогенов или действие стресса активируют разные ветви каскада, в которых терминальными киназами, работающими в ядре, являются ERK, JNK или p38 (Torres et al., 2003; Deng et al., 2004). Показано, что в реализации программы ускоренного старения в нормальных клетках грызунов активация киназы p38 является одним из главных факторов (Wang et al., 2002; Iwasa et al., 2003).

Ранее было обнаружено, что эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, не останавливаются в клеточном цикле при действии ДНК-повреждающих и стрессовых факторов, а гибнут апоптотически (Bulavin et al., 1999). Позднее было обнаружено, что эти автономно пролиферирующие

трансформанты способны останавливаться в цикле после обработки ингибитором деацетилаз гистонов (HDAC1) бутиратом натрия (NaB) (Абрамова и др., 2003). Остановка пролиферации, вызванная NaB, не сопровождалась апоптотической гибелью клеток E1A + cHa-ras. При долговременном блоке клеточного цикла, индуцированном NaB, наблюдали значительное накопление мРНК и белка ингибитора циклинзависимых киназ p21<sup>Waf1</sup> (Абрамова и др., 2003). Для ряда клеточных линий показано, что репликативное старение в них также сопровождается повышением содержания белка p21<sup>Waf1</sup> (Lumpkin et al., 1986; Smith, 1992; Noda et al., 1994). Показано, что при ускоренном старении, вызванном HDAC1, в фибробластах человека и мыши наблюдается формирование фенотипа, сходного с фенотипом, который возникает при репликативном старении (Ogryzko et al., 1996; Xiao et al., 1997; Munro et al., 2004).

В связи с этим целью работы было исследование формирования долговременных блоков клеточного цикла при действии NaB как части программы ускоренного старения, активируемой в нормальных и трансформированных онкогенами клетках грызунов. Основное внимание было направлено на обратимость блока клеточного цикла при действии NaB, изменение активности стресс-киназы p38 и появление маркера старения —  $\beta$ -галактозидазной активности, ассоциированной со старением (SA  $\beta$ -Gal).

### Материал и методика

**Клеточные линии.** Исследования проводили на эмбриональных фибробластах крысы (REF) и стабильно трансформированной линии клеток, полученной из REF путем переноса пары комплементирующих онкогенов E1A и cHa-ras (линия E1A + cHa-ras). Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для изучения индукции клеточного старения в среду добавляли 4 мМ NaB и клетки анализировали через 24, 48, 72 и 144 ч.

**Пролиферативная активность.** Для построения кривых клеточного роста клетки рассевали на чашки Петри диаметром 30 мм в концентрации 10 000 кл./см<sup>2</sup>. Кривые строили на основании подсчета числа клеток в трех чашках каждый день. Действие NaB по кривым роста прослеживали в течение 24, 48, 72 и 96 ч.

**Распределение клеток по фазам клеточного цикла** исследовали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и версена (1 : 1), затем осаждали 3 мин центрифугированием при 350 g и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки инкубировали с 0.01%-ным сапонином в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего вновь промывали PBS и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл) в присутствии иодида пропидия (40 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. Анализ проводили на цитометре типа Odam (Brucker, Франция).

**Оценка обратимости действия NaB по эффективности клонирования.** Для определения числа клеток, сохраняющих способность пролиферировать после действия NaB, через 24, 48 и 144 ч после добавления в среду NaB, клетки снимали с чашек, рассевали на три чашки диаметром 30 мм по 200 клеток на чаш-

ку и через 7 сут оценивали число выросших клонов. Для этого клоны окрашивали раствором 0.4%-ного кристалл-виолета, содержащим 10 % уксусной кислоты и 30 % спирта. Число клонов считали под световым микроскопом.

**Выявление маркера старения SA  $\beta$ -Gal.** Клетки выращивали в чашках Петри на покровных стеклах, промывали PBS и фиксировали в 3%-ном формальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали раствором PBS и инкубировали 18 ч при 37 °С в растворе для выявления активности SA  $\beta$ -Gal, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил  $\beta$ -D-галактозида (X-Gal); 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6.0; 5 мМ красной кровяной соли и 5 мМ желтой кровяной соли; 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl<sub>2</sub> (Dimri et al., 1995). Анализ и фотографирование готовых препаратов производили на микроскопе Leica в проходящем свете.

**Для выявления активных форм киназы p38** методом иммуноблотинга клетки лизировали в PBS, содержащем 1 % NP-40 (Sigma, США), 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз (1 мМ PMSF и по 10 мкг/мл леупептина, пепстатина А и апротинина (Sigma, США) и ингибиторы фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA (Serva, Германия) и 10 мМ фторида натрия). Белки разделяли электрофоретически в 12%-ном ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны со связанными на них белками промывали в PBST (PBS, содержащий 0.5 % Tween-20) и инкубировали в течение 2 ч в 3%-ном бычьем сывороточном альбумине, приготовленном на PBST. После этого мембраны инкубировали в PBST, содержащем 1 % BSA и антитела против фосфорилированной формы киназы p38 (BD Biothecnology, США), в течение ночи при 7 °С. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали при комнатной температуре 1 ч в PBST с 5%-ным молоком, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (NEN, США).

### Результаты

В настоящей работе исследовали индукцию преждевременного старения в нормальных и трансформированных (E1A + cHa-ras) клетках грызунов при действии NaB. В качестве контрольных клеток были использованы фибробласты REF. Как было показано, системы, контролируемые пролиферацией и клеточное старение в контрольных клетках, работают нормально (Benvenuti et al., 2002). Клетки E1A + cHa-Ras не останавливаются в клеточном цикле при удалении ростовых факторов или после действия на них ДНК-повреждающих агентов (Bulavin et al., 1999; Бричкина и др., 2001), однако после действия NaB блоки G<sub>1</sub>/S в них реализуются (Абрамова и др., 2003).

**Влияние бутирата натрия на пролиферативную активность клеток.** Для оценки пролиферативной активности нормальных клеток REF и трансформантов E1A + cHa-ras строили кривые клеточного роста на основании ежедневного подсчета числа клеток в контроле и опыте через 24, 48, 72 и 96 ч действия NaB.

На рис. 1 видно, что NaB быстро подавляет клеточную пролиферацию в нормальных клетках и в трансформантах E1A + cHa-ras, причем уже через 24 ч существенно уменьшается число клеток E1A + cHa-ras, а через 72 ч, когда число клеток в контроле увеличивается почти на порядок по сравнению с исходным значением, число клеток, обработанных NaB, остается практически прежним.

Формирование блоков клеточного цикла в клетках REF и трансформантах E1A + cHa-ras. Анализ данных проточной цитометрии показал, что уже через 24 ч действия NaB наблюдается уменьшение доли клеток REF, находящихся в S-фазе, с 26.66 до 3.00 %, причем часть клеток останавливается на границе фаз G<sub>1</sub>/S (67.57 % против 58.07 % в контроле), а другая часть — на границе фаз G<sub>2</sub>/M (29.43 % против 15.27 % в контроле). Через 48 ч действия NaB доля клеток на границе G<sub>1</sub>/S увеличивается еще больше (78.40 %), а доля S-фазных клеток снижается до 2.51 %. Продление времени инкубации с NaB до 144 ч приводит к снижению числа клеток в S-фазе до 1.53 % и блоку клеточного цикла как на границе G<sub>2</sub>/M (32.07 %), так и на границе G<sub>1</sub>/S (66.40 %) фаз клеточного цикла (рис. 2, а).

У трансформантов E1A + cHa-ras через 24 и 48 ч действия NaB тоже возникает блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S: доля клеток в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла увеличивается с 58.53 % в контроле до 91.89 и 93.07 % в опыте через 24 и 48 ч соответственно (рис. 2, б). Так как в трансформантах E1A + cHa-ras плотно-зависимое ингибирование пролиферации отсутствует, блок клеточного цикла в этих клетках в отличие от REF является следствием только действия NaB. Инкубация трансформантов E1A + cHa-ras с NaB в течение 144 ч практически не изменяет картину распределения клеток по фазам клеточного цикла, выявленную через 24 ч.

Обратимость антипролиферативного действия NaB оценивали по способности клеток пролиферировать в клональном посеве через разные промежутки времени действия ингибитора. Как видно на рис. 3, через 48 ч действия NaB число выросших клонов снижается до 100 по сравнению со 140 клонами в контроле. Однако через 144 ч действия HDACi ситуация принципиально меняется: трансформанты E1A + cHa-ras фактически теряют способность пролиферировать. Полученные данные свидетельствуют о том, что для необратимого антипролиферативного действия NaB необходимо длительное действие ингибитора на трансформанты E1A + cHa-ras.

Экспрессия маркера старения SA β-Gal в трансформантах E1A + cHa-ras после обработки NaB. Через 48 ч инкубации клеток E1A + cHa-ras с NaB уже выявляется существенная активность SA β-Gal (рис. 4, з), которая через 144 ч усиливается еще больше и наблюдается практически во всех клетках (рис. 4, д). Действие NaB на клетки, трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras, по-видимому, вызывает необратимую остановку пролиферации по типу ускоренного старения, так как вызывает необратимый блок клеточного цикла одновременно с активацией экспрессии маркера старения.

Накопление активной фосфорилированной формы стресс-киназы p38 в трансформантах E1A + cHa-ras после действия NaB. Как видно из данных иммуноблотинга, представленных на рис. 5, присутствие NaB в среде культивирования клеток

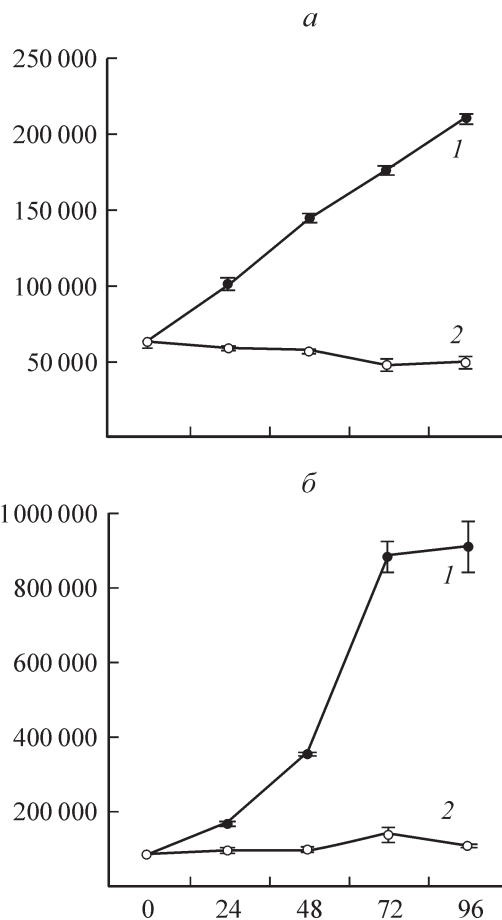


Рис. 1. Кривые роста нормальных эмбриональных фибробластов крысы (а) и их трансформантов E1A + cHa-ras (б) в контроле (1) и при действии 4 мМ бутирата натрия (2).

По оси абсцисс — время воздействия бутирата натрия, ч; по оси ординат — плотность клеток на 1 см<sup>2</sup>.

Fig. 1. Growth curves of normal rat embryo fibroblasts (a) and their E1A + cHa-ras transformants (b): control cells (1) and cells after treatment with 4 mM sodium butyrate (2).

Horizontal — duration of the treatment with 4 mM sodium butyrate (h); vertical — density, cell/cm<sup>2</sup>.

E1A + cHa-ras в течение 24—48 ч не приводит к значительному увеличению уровня фосфорилирования киназы p38 по сравнению с достаточно высоким уровнем ее в контроле. Однако через 72 ч содержание фосфорилированной киназы p38 и, по-видимому, ее активность значительно возрастают. Данные по накоплению активных форм стресс-киназы p38 хорошо коррелируют с результатами по зависимости обратимости пролиферативного блока, индуцированного NaB, от продолжительности его воздействия. Блок клеточного цикла в трансформантах E1A + cHa-ras становится полностью необратимым не ранее чем через 72 ч действия NaB, когда содержание активных форм киназы p38 резко возрастает.

## Обсуждение

Нормальные клетки эукариот обладают сложной системой регуляции пролиферации, определяющей формирование адекватных ответов на разнообразные внешние стимулы. При строго координированной работе этой си-

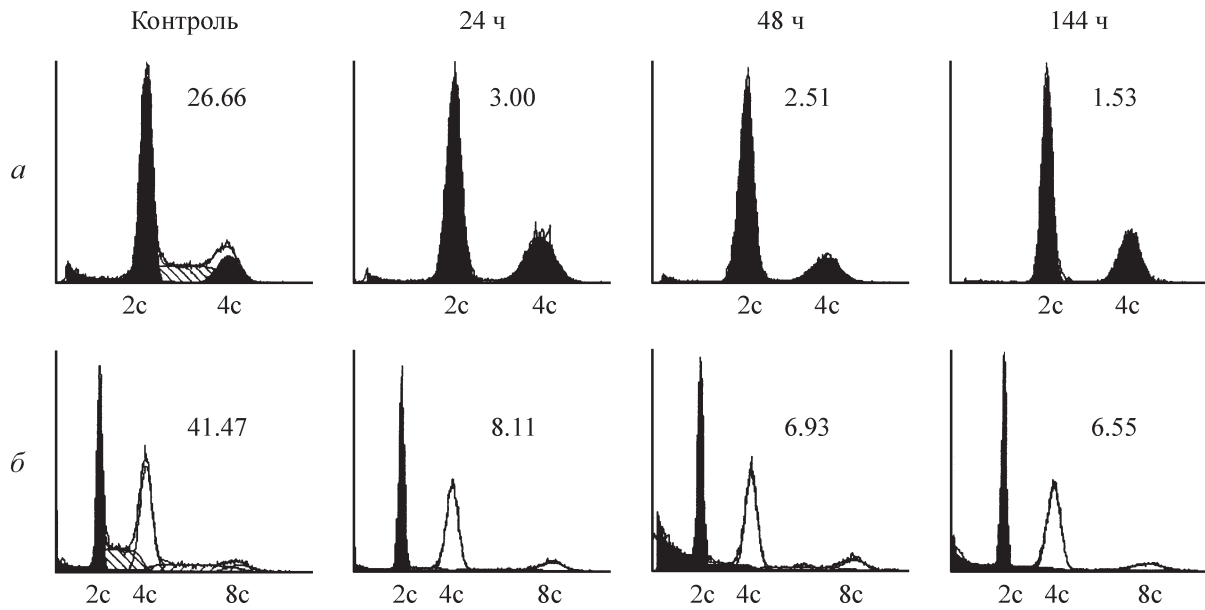


Рис. 2. Зависимость распределения эмбриональных фибробластов крысы (а) и их трансформантов E1A + cHa-ras (б) по фазам клеточного цикла от времени действия 4 мМ бутирата натрия.

По горизонтали — содержание ДНК; на каждой гистограмме указана доля (в %) клеток, находящихся в фазе S.

Fig. 2. Distribution of rat embryo fibroblasts (a) and their E1A + cHa-ras transformants (b) along the cell cycle phases depending on the duration of the treatment with 4 mM sodium butyrate.

Horizontal — DNA content; cell percentage (%) in S-phase is indicated in each histogram.

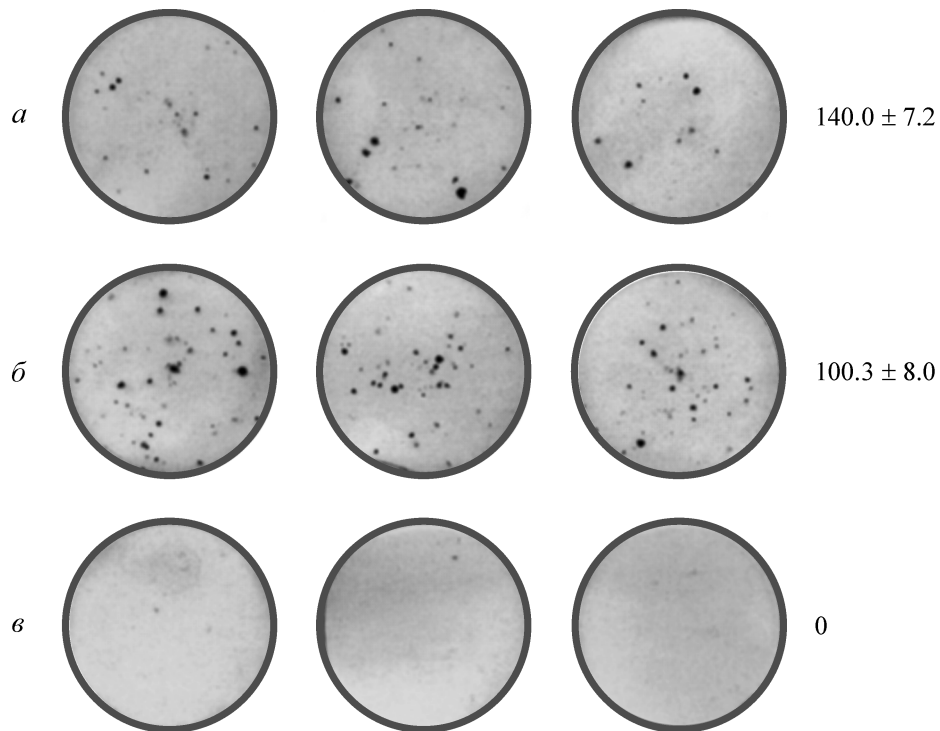


Рис. 3. Формирование клонов эмбриональными фибробластами крысы, трансформированными онкогенами E1A и cHa-ras, предварительно обработанными 4 мМ бутиратом натрия в течение разного времени.

a — контроль; б, в — 48 и 144 ч действия бутирата натрия соответственно. Цифры справа — число клонов.

Fig. 3. Clone forming by the E1A + cHa-ras transformants pretreated with 4 mM sodium butyrate at different time intervals.

a — control; б, в — 48 and 144 h sodium butyrate treatment, respectively. Digits on the right — the number of clones.

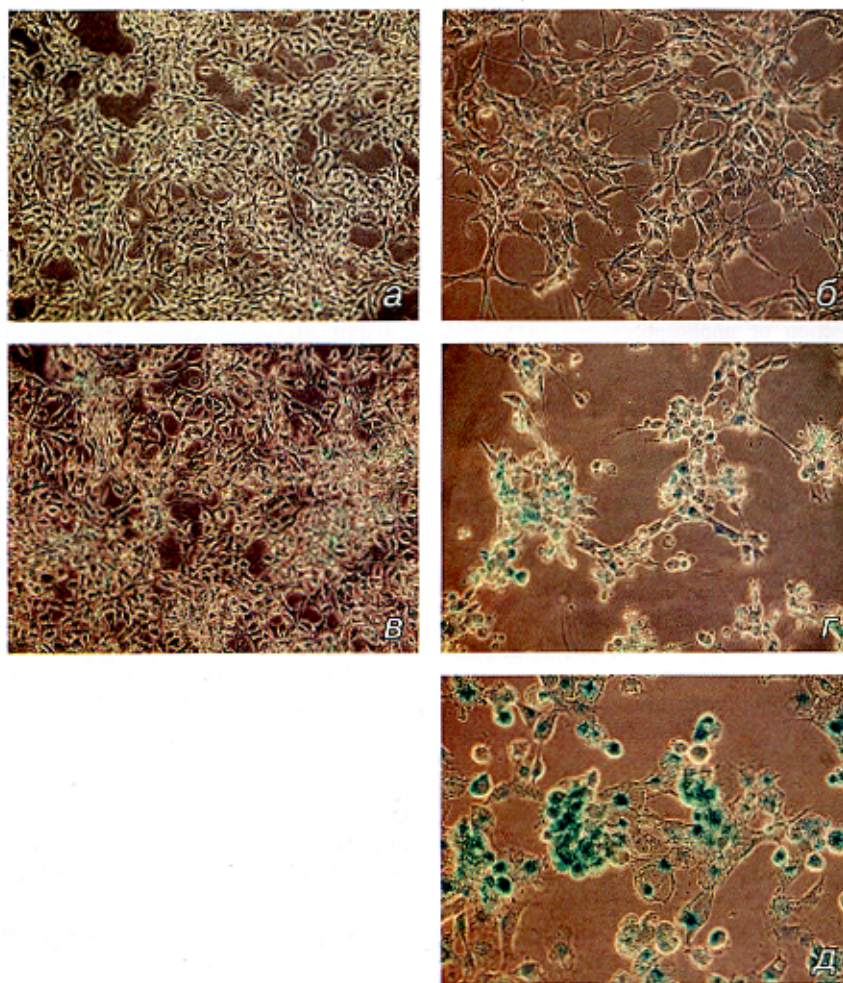


Рис. 4. Выявление маркера старения (ассоциированной со старением β-галактозидазы) с помощью окраски специальным буферным раствором, содержащим X-Gal при pH 6.0, в эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*.

*a, б* — контрольные клетки через 24 и 48 ч культивирования соответственно; *в, г, д* — клетки через 24, 48 и 144 ч действия 4 мМ бутирата натрия соответственно. Об. 40×.

Fig. 4. Detection of senescence biomarker (senescence associated β-galactosidase) by special staining with buffer solution (pH 6.0) containing X-Gal in *E1A* + *cHa-ras* transformants.

*a, б* — control cells after 24 and 48 h of cultivating, respectively; *в, г, д* — cells after 24, 48 and 144 h of treatment with 4 mM sodium butyrate, respectively. Ob. 40×.

стемы в клетке осуществляется контроль над клеточным циклом и генетической стабильностью. В норме клетки останавливаются в клеточном цикле в ответ на антипролиферативные стимулы, такие как удаление ростовых факторов из среды или действие ДНК-повреждающих агентов. Если во время таких остановок генетические нарушения исправить не удастся, то клетка либо гибнет путем апоптоза, либо активирует программу старения и прекращает пролиферировать. Однако в опухолевых клетках строгий контроль над событиями клеточного цикла после действия повреждающих агентов нарушен, что выражается в неспособности генетически поврежденных клеток останавливаться в сверхочных точках клеточного цикла. Это приводит к высокой генетической нестабильности и гетерогенности популяций опухолевых клеток и как следствие — к появлению автономно пролиферирующих вариантов, которые обладают селективными преимуществами. Кроме того, в опухолевых клетках нарушена программа апоптоза, что приводит к

дополнительному накоплению генетических нарушений в популяции (Копнин, 2000). В связи с этим изучение активации ускоренного клеточного старения как антиканцерогенной программы в опухолевых клетках и поиск соответствующих агентов имеют большое значение для разработки новых подходов к терапии опухолей.

В нашей работе активация клеточного старения была исследована в трансформированных клетках грызунов. Поскольку хромосомы клеток грызунов имеют очень длинные теломеры, изучаемое нами клеточное старение относится к категории теломернезависимого старения (Sherr, DePinho, 2000). Одним из индукторов такого старения является онкогенная форма *ras*, однако при переносе его в нормальные клетки в паре с другим иммортализирующим онкогеном программа старения отменяется и происходит полная онкогенная трансформация клетки. Исследованные нами эмбриональные фибробласты крыс, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, проявляют сходные с рядом опухолевых клеток черты: неспо-

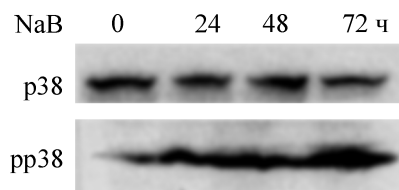


Рис. 5. Выявление методом иммуноблоттинга содержания нефосфорилированных (*p38*) и фосфорилированных (*pp38*) форм киназы *p38* в трансформантах E1A + cHa-ras в контроле и через 24, 48 и 72 ч действия 4 мМ бутирата натрия.

Fig. 5. Immunoblotting detection of unphosphorylated (*p38*) and phosphorylated (*pp38*) *p38* kinase content in E1A + cHa-ras transformants in control and after 24, 48 and 72 h of treatment with 4 mM sodium butyrate, respectively.

способность останавливаться в клеточном цикле при нехватке ростовых факторов или после действия ДНК-повреждающих агентов (Bulavin et al., 1999; Бричкина и др., 2001).

В качестве агента, индуцирующего старение, нами был выбран HDAC1 — бутират натрия. Характер его действия зависит от типа клеток и тканевой принадлежности, и в ряде случаев он индуцирует развитие апоптоза в клетке (Voisteanu et al., 1997). Ранее нами было показано, что в трансформантах E1A + cHa-ras NaB вызывает блок клеточного цикла, при этом остановка пролиферации не сопровождается апоптотической гибелью клеток (Абрамова и др., 2003). После воздействия NaB снижается экспрессия положительных регуляторов клеточного цикла — циклинов D1, A, E и циклинзависимых киназ Cdk2 и Cdk4, тогда как экспрессия ингибитора циклинзависимых киназ белка p21<sup>Waf1</sup> повышается (Абрамова и др., 2003).

Настоящее исследование показало, что формирующиеся после воздействия NaB блоки клеточного цикла в трансформированных клетках, скорее всего, являются частью развивающейся программы старения, поскольку они необратимы. Кроме того, NaB вызывал экспрессию маркера старения SA β-Gal в трансформированных клетках, причем трансформанты E1A + cHa-ras полностью утрачивали способность пролиферировать на фоне высокой активности SA β-Gal. Этот факт согласуется с данными о том, что только старение приводит к необратимому блоку пролиферации (Mathon, Lloyd, 2001), тогда как удаление ростовых факторов или действие ДНК-повреждающих агентов без включения программы старения вызывают появление блоков клеточного цикла и переводят клетки в состояние покоя, которое обратимо (Blagosklonny, 2003). Недавно было показано, что NaB индуцирует программу старения в разных опухолевых клетках, в частности карциномы матки и яичника человека (Terao et al., 2001).

В настоящее время NaB рассматривают в качестве потенциального антиканцерогенного препарата, который можно использовать в клинике (Terao et al., 2001). Однако одно из главных требований к нему — не влиять на пролиферацию нормальных клеток организма. Результаты цитометрического анализа показали, что в нормальных клетках REF NaB также может вызывать процесс, напоминающий преждевременное старение. Не исключено, что это связано с тем, что исследованные нами клетки REF прошли несколько пассажей *in vitro* и отличаются от фибробластов *in vivo* по способности активировать программу ускоренного старения. Косвенно

это предположение подтверждается данными, которые указывают на невозможность развития ускоренного Ras-индуцированного старения в свежих, только что эксплантированных фибробластах, которые вместо старения под влиянием активного Ras начинают трансформироваться (Benanti, Galloway, 2004). В фибробластах, прошедших в культуре несколько пассажей, развивается чувствительность к Ras-индуцированному старению.

Маркер старения SA β-Gal значительно экспрессировался в трансформантах E1A + cHa-ras. Этот факт может объясняться тем, что онкоген *ras* способен опосредовать сигнал, индуцирующий старение. Конститутивная активация онкогена *ras* стимулирует все три ветви митоген-активируемого протеинкиназного каскада (ERK, *p38* и JNK). В трансформантах E1A + cHa-ras была выявлена конститутивная активность всех трех киназ — ERK, JNK и *p38* — по сравнению с исходными фибробластами (Светликова и др., 2001). Однако даже в этом случае NaB вызывает накопление фосфорилированной формы киназы *p38* после долговременной (не менее 72 ч) обработки клеток E1A + cHa-ras. Недавно было показано, что в регуляции программы ускоренного старения в нормальных клетках активация киназы *p38* является одним из главных факторов. Авторами было установлено, что при активации киназ ERK или JNK происходит стимуляция пролиферации клеток, а при активации киназы *p38* наблюдается ускоренное старение клетки. Блок пролиферации, возникающий на фоне повышенной экспрессии киназ MEK1, MKK3 или MKK6, снимался при действии ингибиторов киназы *p38*, что указывает на решающую роль *p38* в торможении клеточной пролиферации по типу ускоренного старения (Wang et al., 2002).

Как правило, стареющие клетки устойчивы к апоптозу. Клеточное старение и апоптоз, по-видимому, представляют собой два различных механизма подавления развития программы канцерогенеза в клетке. После остановки в сверхточных точках клеточного цикла нормальных клеток, во время которой поврежденные клетки корректируют генетические дефекты, либо возобновляется пролиферация, либо реализуется программа апоптоза. В ходе канцерогенеза в клетке должны быть разрушены системы контроля над целостностью генома и подавлены программы апоптоза и старения. Однако не исключено, что в силу доминантности программы старения различные внешние воздействия, в том числе антиканцерогенные препараты, могут ее вновь индуцировать даже в тех клетках, которые утратили способность погибать путем апоптоза. Именно поэтому в настоящее время старение рассматривается как основная антиканцерогенная программа, которая может быть индуцирована в клетке действием дифференцировочных агентов или противоопухолевых препаратов. Можно предположить, что программа старения обладает уникальной способностью противостоять канцерогенезу; «постаревшая» популяция опухолевых клеток полностью теряет способность к пролиферации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49766 и 03-04-49377) и гранта CRDF Rb1-2511-ST-03.

#### Список литературы

Абрамова М. В., Светликова С. Б., Аксенов Н. Д., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2003. Ингибитор деацетилаз гистонов

останавливает пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Цитология. 45 (11) : 1100—1108.

Бричкина А. И., Тарарова Н. Д., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2001. Трансформанты, полученные из эмбриональных фибробластов крысы комплементацией онкогенов *E1A* + *E1B-19kDa* и *E1A* + *cHa-ras*, различаются по способности реализовать блок  $G_1/S$  в условиях сывороточного голодания. Цитология. 43 (11) : 1024—1030.

Копнин Б. П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65 (1) : 5—33.

Рингерц Н., Севидж Р. 1979. Гибридные клетки. М.: 415 с.

Светликова С. Б., Абрамова М. В., Кукушкин А. Н., Дариева З. А., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2001. Конститутивная активность MAP-киназных каскадов в клетках REF, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Цитология. 43 (10) : 961—968.

Benanti J. A., Galloway D. A. 2004. Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. Mol. Cell. Biol. 24 : 2842—2852.

Benvenuti S., Cramer R., Quinn C. C., Bruce J., Zvebil M., Corless S., Bond J., Yang A., Hockfield S., Burlingame A. L., Waterfield M. D., Jat P. S. 2002. Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. Mol. Cell. Proteomics. 1 : 280—292.

Blagosklonny M. V. 2003. Cell senescence and hypermitogenic arrest. EMBO Rep. 4(4) : 358—362.

Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science. 279 : 349—352.

Boisteau O., Gautier F., Cordel S., Henry F., Harb J., Douillard J. Y., Vallette F. M., Mejlak K., Gregoire M. 1997. Apoptosis induced by sodium butyrate treatment increases immunogenicity of a rat colon tumor cell line. Apoptosis. 2 : 403—412.

Bulavin D., Tararova N., Aksekov N., Pospelov V., Pospelova T. 1999. Deregulation of p53/p21<sup>Cip1</sup>/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of *E1A* + *cHa-ras* transformed cells after gamma-irradiation. Oncogene. 18 : 5611—5619.

Deng O., Liao R., Wu B. L., Sun P. 2004. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. J. Biol. Chem. 279 : 1050—1059.

Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke V., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 9363—9367.

Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37 : 614—636.

Iwasa H., Han J., Ishikawa F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. Genes and Cells. 8 : 131—144.

Lumpkin C. K., Jr., McClung J. K., Pereira-Smith O. M., Smith J. R. 1986. Existence of high abundance antiproliferative mRNA's in senescent human diploid fibroblasts. Science. 232 : 393—395.

Mathon N. F., Lloyd A. C. 2001. Cell senescence and cancer. Nat. Rev. Cancer. 1 : 203—213.

Munro J., Barr N. I., Ireland H., Morrison V., Parkinson E. K. 2004. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. Exp. Cell Res. 295 : 525—538.

Noda A., Ning Y., Venable S. F., Pereira-Smith O. M., Smith J. R. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp. Cell Res. 211 : 90—98.

Ogryzko V. V., Hirai T. H., Russanova V. R., Barbie D. A., Howard B. H. 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. Mol. Cell. Biol. 16 : 5210—5218.

Roninson I. B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. Cancer Res. 63 : 2705—2715.

Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell. 88 : 593—602.

Sherr C. J., DePinho R. A. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? Cell. 102 : 407—410.

Smith J. R. 1992. Inhibitors of DNA synthesis derived from senescent human diploid fibroblasts. Exp. Gerontol. 27 : 409—412.

Terao Y., Nishida J., Horiuchi S., Rong F., Ueoka Y., Matsuda T., Kato H., Furugen Y., Yoshida K., Kato K., Wake N. 2001. Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. Int. J. Cancer. 94 : 257—267.

Torres C., Francis M. K., Lorenzini A., Tresini M., Cristofalo V. J. 2003. Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. Exp. Cell Res. 209 : 195—206.

Wang W., Chen J. X., Liao R., Deng Q., Zhou J. J., Huang S., Sun P. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-activated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. Mol. Cell. Biol. 2 : 3389—3403.

Wei S., Sedivy J. M. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. Cancer Res. 59 : 1539—1543.

Xiao H., Hasegawa T., Miyaishi O., Ohkusu K., Isobe K. 1997. Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in p53-independent manner. Biochem. Biophys. Res. Commun. 237 : 457—460.

Zhu J., Woods D., McMahon M., Bishop J. M. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. Genes Develop. 12 : 2997—3007.

Поступила 12 IV 2005

#### INDUCTION OF PREMATURE SENESCENCE PROGRAM BY AN INHIBITOR OF HISTONE DEACETYLASE SODIUM BUTYRATE IN NORMAL AND TRANSFORMED RAT FIBROBLASTS

Yu. G. Zubova, T. V. Bykova, S. G. Zubova, M. V. Abramova, N. D. Aksekov, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: jul\_zubova@mail333.com

We investigated a possibility to induce the premature cell senescence in rat embryo fibroblasts and *E1A* + *cHa-ras* transformants. We found that after the treatment with sodium butyrate, an inhibitor of histone deacety-

lases, both normal and transformed cells completely stopped to proliferate and accumulated at G<sub>1</sub>/S and G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. The cloning efficiency data show that the cell cycle arrest induced by sodium butyrate is irreversible and correlates with the accumulation of active phosphorylated form of stress kinase p38, and with the expression of marker of senescence —  $\beta$ -galactosidase activity (SA  $\beta$ -Gal). The program resembling the premature senescence after sodium butyrate treatment is supposed to develop both in normal and transformed cells. The irreversible block of proliferation in *E1A + cHa-ras* transformants may be regarded as an example of activation of anticancer program like that of premature senescence in the tumor rodent cells.

Key words: transformation, senescence, cell cycle, histone deacetylase inhibitor.

---