

ХАРАКТЕРИСТИКА СПОНТАННО ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА ECV304

II. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК

© Н. Я. Гильяно,¹ Е. Г. Семенова,² Р. Ф. Федорцева,³ Л. В. Коневега¹

¹ Петербургский институт ядерной физики РАН им. Б. П. Константинова, Гатчина,

² Институт цитологии РАН и ³ Всероссийский центр экстренной
и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

Исследованы функциональные особенности спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304 с целью оценки ее адекватности в качестве эндотелиальной клеточной модели при изученииangiогенеза и сигнальной трансдукции. Показана зависимость пролиферативной активности этой линии от присутствия ростовых факторов. Отсутствие сыворотки в питательной среде приводит к блокированию клеток в G₁-фазе клеточного цикла, что не свойственно опухолевым клеточным линиям. Низкие дозы β-частиц, испускаемых при распаде [³H]-тимидина, блокировали пролиферацию этих клеток в G₂/M-фазе дозозависимым образом. Инкубирование клеток в среде с ³H₂O приводило к преимущественной аккумуляции клеток в S-фазе при равных удельных активностях трития. Сверочная точка G₁/S отсутствует, что согласуется с наличием делеции хромосомы 9 в локусе p21. Различная эффективность β-частиц трития в составе молекулы воды или в составе тимидина демонстрирует, что в основе различных чек-поинтов лежат разные механизмы. В клетках ECV304 регистрировался относительно низкий уровень NO, продуцируемый конститутивной формой эндотелиальной NO-синтазы, который не модифицировался ингибиторами индуцибелльной NO-синтазы. Полученные результаты позволяют предположить, что клетки нашей линии ECV304 сохранили свойства исходной, спонтанно трансформированной, клеточной линии, полученной из эндотелиальных клеток пуповинной вены человека (HUVEC), и могут быть использованы в качестве модельной системы для дальнейших исследований свойств сосудистого эндотелия.

Ключевые слова: ECV304, пролиферация, β-частицы, блоки G₁, S/G₂ и G₂/M, проточная цитометрия, радиометрия.

Принятые сокращения: DAF-2 DA — 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат, D-NAME — ω-нитро-D-аргинина метиловый эфир, L-NAME — ω-N-нитро-L-аргинина метиловый эфир.

Морфологические, иммунохимические и генетические исследования, выполненные на линии ECV304, обеспечили этой линии право на использование ее в качестве модельной системы для биомедицинских исследований angiогенеза *in vitro* и сигнальной трансдукции (Hughes, 1996; Suda et al., 2002). Однако в последнее время ряд авторов (Brown et al., 2000; Drexler et al., 2002) подвергает сомнению принадлежность этой линии к эндотелиальной, поскольку ими была показана ее генетическая идентичность с клеточной линией рака мочевого пузыря T24. Кроме того, по их данным, пролиферация клеток линий ECV304 и T24, измеренная по инкорпорации [³H]-тимидина (0.04 МБк/мл) в ДНК, не зависела от наличия сыворотки в отличие от эндотелиальных клеток аорты быка. Известно, что способность к пролиферации в отсутствие ростовых факторов является отличительной чертой опухолевых клеток (Hanahan, Weinberg, 2000). Фармакологический и биохимический анализ экспрессии рецепторов выявил существенные различия между ECV304 и первич-

ными культурами эндотелиальных клеток. Известна важность рецепторов P2Y для эндотелиальных клеток, поскольку эти рецепторы связаны с продукцией NO. В клетках ECV304 проявлялась довольно высокая активность NO-синтазы, оцененная по конверсии [³H]-аргинина (0.024 МБк/мл) в [³H]-цитрулин, которая ингибировалась L-NAME (ω-N-нитро-L-аргинина метиловым эфиром) и стимулировалась антагонистом рецепторов P2Y. Активация рецепторов P2Y не индуцировала синтез простагландинов в клетках ECV304.

В первой части исследования с помощью окрашивания хромосом на G-диски было показано, что кариотип исследуемой нами линии ECV304 отличается от кариотипа клеток линии T24 (Harding et al., 2002) как по модальному числу хромосом, так и по составу структурных перестроек хромосом (Ярцева и др., 2008).

Целью данной работы было изучение пролиферативных особенностей клеточной линии ECV304 в норме и после воздействия β-частиц, испускаемых при распаде

трития, в концентрациях, обычно используемых для исследования клеточного метаболизма, а также измерение внутриклеточного уровня NO и возможности его модификации специфическими и неспецифическими ингибиторами NO-синтазы.

Материал и методика

Клеточные линии и их культивирование. Эндотелиальные клетки человека линии ECV304 (Институт цитологии РАН) культивировали во флаконах Карреля на среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин.

Радиометрический анализ. Для радиометрической оценки пролиферации эндотелиальных клеток использовали [³H-метил]-тимидин и тритиевую воду ³H₂O (Изотоп ФГУП, Россия). Конечная максимальная концентрация изотопа в питательной среде составляла 0.066 МБк/мл как для тимидина, так и для тритиевой воды. Пробы ДНК из лизированных клеток ($\sim 10^4$) переводили на нитроцеллюлозные фильтры. После высушивания фильтры помещали в толуольный сцинтиляционный раствор для радиометрии [³H]-тимидина и в диоксановый раствор для радиометрии ³H₂O и просчитывали в счетчике Beckman-LS5801.

Цитофлуориметрический анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины Петербургского института ядерной физики РАН (Stepanov et al., 1996). Окрашивание живых клеток проводили в 0.1%-ном растворе бромистого этидия за 15 мин до анализа на цитометре без последующей отмычки красителя. Анализ гистограмм (процентное соотношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью компьютерной программы (созданной сотрудником Петербургского института ядерной физики РАН Н. В. Клоповым), которая является модифицированной формой программы (Dean, 1982). В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток.

Изменения внутриклеточного уровня NO определяли по изменению интенсивности флуоресценции клеток. Для этой цели использовали флуоресцирующий краситель 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2 DA) (Sigma, США), который легко проникает в клетку, где под действием клеточных эстераз гидролизуются его эфирные связи, генерируя при этом относительно нефлуоресцентный и мембранонепроницаемый DAF-2. В клетках DAF-2 реагирует быстро и необратимо с NO концентрационно-зависимым образом и производит высокофлуоресцентный триазолфлуоресцеин DAF-2 T ($\lambda_{\text{excit}} = 480 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{emis}} = 510 \text{ нм}$), который образуется только в присутствии NO. Другие кислородсодержащие соединения азота (ONO⁻, NO₂⁻ и NO₃⁻) и активные формы кислорода (O₂⁻, H₂O₂) не реагируют с DAF-2 (Naganano, 1999). Специфичность и высокая чувствительность такого флуоресцентного индикатора делают возможным анализ внутриклеточного уровня NO в реальном времени жизни клетки. Конечная концентрация красителя составляла 5 мкМ, время инкубации с красителем при 37 °C — 30 мин.

Обработка клеток ингибиторами NO-синтазы. В качестве неспецифического ингибитора NO-син-

тазы использовали L-NAME (ω -N-нитро-L-аргинина метиловый эфир), а также его неактивный изомер D-NAME (ω -N-нитро-D-аргинина метиловый эфир), синтезированные в Лаборатории органического синтеза Петербургского института ядерной физики (ПИЯФ РАН). В качестве специфического ингибитора индуцильной NO-синтазы использовали аминогуанидин (Ferak, Германия). Ингибиторы разводили в питательной среде непосредственно перед использованием до конечной концентрации 0.07 мМ. Продолжительность инкубации клеток в среде с ингибиторами составляла 2 ч.

Результаты

При культивировании линии ECV304 была зарегистрирована высокая чувствительность клеток к различным типам сыворотки. Смена одной партии сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург, Россия) на другую (ПанЭко, Москва, Россия) приводила к всплеску апоптотической гибели клеток в течение первых трех пассажей. Замена эмбриональной сыворотки (Биолот) на обычную сыворотку крупного рогатого скота (той же фирмы) изменила адгезивные свойства клеток: с монослоя легче встраивались митотические клетки, а сам монослой быстрее снимался раствором Версена. Отсутствие сыворотки в среде приводило к ингибированию пролиферации эндотелиальных клеток и остановке в G₁-фазе клеточного цикла (рис. 1). При этом инкубация клеток в среде без сыворотки в течение 48 ч не индуцировала апоптотической гибели клеток (отсутствие на цитометрических гистограммах клеточной популяции с содержанием ДНК меньше чем 2 с). Остановка клеток в G₁-фазе клеточного цикла была обратимой, поскольку замена голодной среды на полную приводила к включению меченого предшественника [³H]-тимидина в ДНК клеток (рис. 2). При инкубации клеток в среде без сыворотки инкорпорация меченого предшественника в ДНК не регистрировалась. После добавления сыворотки в среду наблюдалось постепенное увеличение радиоактивности к 28 ч; это свидетельствует о том, что клетки остановились в G₁-фазе, а не на границе G₁/S.

Поскольку сывороточное голодание приводит к высокой степени синхронизации этой клеточной линии в G₁-фазе, мы попытались исследовать кинетику прохождения клетками фаз клеточного цикла после 48 ч культивирования в среде без сыворотки, оценивая распределение клеток по содержанию ДНК в течение 33 ч после смены среды без сыворотки на среду с сывороткой. Анализ цитометрических гистограмм приведен в табл. 1. В течение первых 10 ч после смены бессывороточной среды на среду с сывороткой часть клеток, задержанных сывороточным голоданием в G₂-фазе, переходит в G₁-фазу, снижается доля клеток с содержанием ДНК 4с и увеличивается доля клеток с содержанием ДНК 2с. Через 13 ч после инкубации в полной среде начинает увеличиваться доля клеток с содержанием ДНК больше 2с и меньше 4с, условно обозначаемых как клетки с содержанием ДНК 3с: это клетки в S-фазе. Увеличение доли клеток с содержанием ДНК 3с происходит до 26 ч после смены среды. Через 26–28 ч регистрируется максимальная доля клеток с содержанием ДНК 4с (пик G₂-фазы). Через 31 ч наблюдается увеличение клеток в G₁. Примерно половина (47 %) всей клеточной популяции либо так и не выходит из G₁, либо находится в G₀, либо медленнее продвигается по стадиям клеточного цикла.

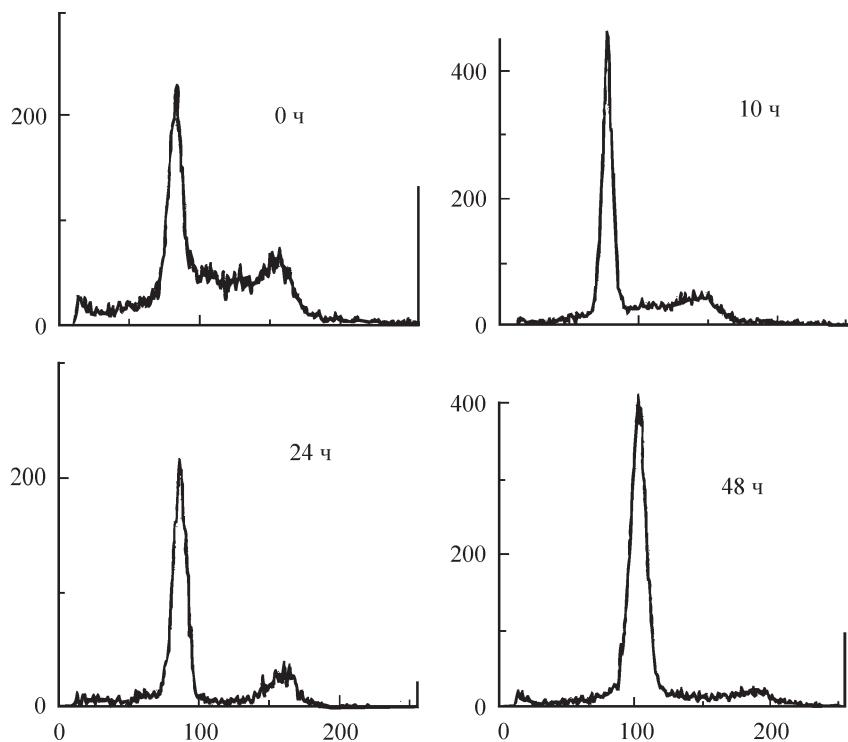


Рис. 1. Распределение клеток по содержанию ДНК при культивировании их в течение разного времени в среде, не содержащей сыворотки.

По оси абсцисс — флуоресценция, усл. ед.; по оси ординат — число клеток.

Мы попытались оценить долю клеток, прошедших фазу синтеза ДНК после замены среды без сыворотки на среду с сывороткой, инкубируя их в среде с [³H]-тимидином (0.066 МБк/мл) на протяжении всего исследуемого периода. Продолжительность инкубации клеток в бессы-

ворточной среде уменьшили с 48 до 18 ч. На протяжении 32 ч мы фиксировали по одному флякону Кэрреля через каждые 2 ч. Часть клеточной суспензии (10^4) осаждали на фильтрах, которые затем помещали в толуольный сцинтиллятор, и измеряли активность [³H]-тимидина на счетчике. Оставшуюся часть суспензии окрашивали бромистым этидием и анализировали на проточном цитометре. Результаты цитометрического анализа распределения клеток по содержанию ДНК в течение 32 ч после смены среды без сыворотки на среду с [³H]-тимидином представлены в табл. 2. Инкубация клеток в среде без сыворотки в течение 18 ч приводит к остановке клеток в G₁-фазе (82 % всей популяции).

Как и в предыдущем эксперименте, максимальное снижение доли клеток в G₁-фазе наступает через 26 ч, что позволяет сделать предположение о 26-часовой продолжительности генерационного цикла этой линии. Однако в данном эксперименте через 26 ч инкубации в полной питательной среде доля клеток в G₁-фазе составляет всего 20 % от всей клеточной популяции, а не 47 %, как в предыдущем эксперименте. Скорее всего, это обусловлено снижением продолжительности инкубации клеток в бессывороточной среде с 48 до 18 ч. Продолжительность инкубации клеток в бессывороточной среде, по-видимому, определяет пролиферативный пул в этой линии клеток, что еще раз подчеркивает как ее зависимость от сыворотки, так и блокирование пролиферации в G₁-фазе. Доля клеток в S-фазе растет начиная с 8 ч (13 %), достигая максимума через 20—22—24 ч (31—24—19 %), и через 26—28 ч снижается (15—10 %). Доля клеток в G₂-фазе начинает расти с 18 ч (27 %) и все время растет, достигая максимума 62 % к 30 ч, но и через 31 и 32 ч доля клеток остается очень высокой (47 %). Очевидна аккумуляция клеток в G₂-фазе клеточного цикла. Проведенный парал-

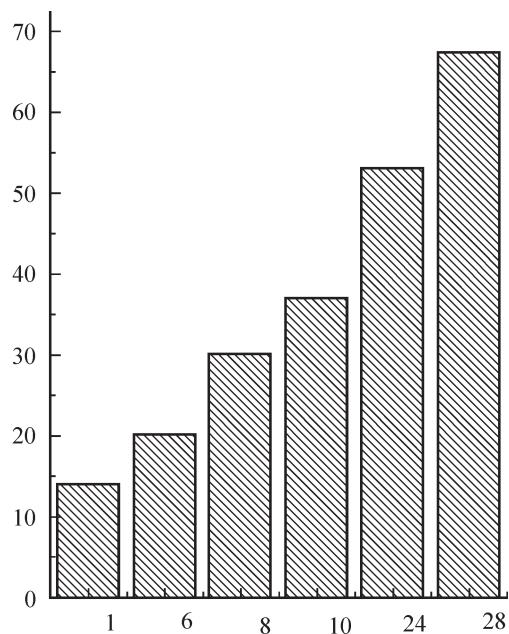


Рис. 2. [³H]-активность ДНК клеток после смены бессывороточной среды на среду, содержащую сыворотку.

По горизонтали — время после смены среды, ч; по вертикали — [³H]-активность, имп/мин (соответствует числу регистрируемых актов распада ³H за 1 мин 10^4 клеток). Время включения [³H]-тимидина 1 ч.

Таблица 1

Распределение клеток по содержанию ДНК в течение первых 33 ч после смены бессывороточной среды на среду с сывороткой

Фаза цикла	Время, ч															
	1	4	8	10	13	16	18	20	22	24	26	28	30	31	32	33
G ₁ (2c)	72	82	86	85	78	76	59	61	57	53	47	55	56	57	62	64
S (3c)	5	5	5	6	11	14	18	15	17	20	20	14	15	14	18	19
G ₂ (4c)	23	13	9	9	11	10	23	24	26	27	33	31	29	29	20	17

Таблица 2

Распределение клеток по содержанию ДНК в течение 32 ч после смены среды без сыворотки на среду, содержащую сыворотку и [³H]-тимидин (0.066 МБк/мл)

Фаза цикла	Время, ч												
	1	4	8	10	18	20	22	24	26	28	30	31	32
G ₁ (2c)	82	86	75	75	47	36	30	28	28	28	32	32	34
S (3c)	9	7	13	13	26	31	24	19	15	13	6	9	9
G ₂ (4c)	9	7	12	12	27	34	46	53	57	59	62	59	57

льно радиометрический анализ клеточной суспензии подтвердил аккумуляцию клеток в G₂-фазе клеточного цикла. На рис. 3 видно, что инкорпорация [³H]-тимидина в ДНК клеток, стимулированных к пролиферации заменой среды без сыворотки на среду с сывороткой, постепенно увеличивается и выходит на плато через 22 ч, сохраняясь на этом уровне на протяжении последующих 10 ч.

Мы снизили концентрацию [³H]-тимидина 0.066 МБк/мл вдвое (0.033 МБк/мл) и почти на порядок (0.008 МБк/мл), оставив неизменной продолжительность обработки и таким образом попытались оценить дозовую зависимость задержки клеток в G₂-фазе. Результаты анализа представлены на рис. 4, а, где видно, что все исследуемые концентрации [³H]-тимидина индуцировали нахождение клеток в G₂-фазе клеточного цикла.

Известно, что [³H]-тимидин инкорпорируется в ДНК клеток и β-частицы, испускаемые при распаде трития, возникают непосредственно в чувствительной мишени (ДНК). Представлялось интересным сравнить эффективность β-частиц, испускаемых при распаде трития в составе [³H]-тимидина, и в составе тритиевой воды, поскольку при использовании ³H₂O тритий равномерно распределен внутри клеточного объема, хотя и вне чувствительной мишени, но в непосредственной близости от нее. Активность, сроки и продолжительность обработки клеток ³H₂O и [³H]-тимидином были практически идентичными. Клетки, синхронизированные в G₁-фазе посредством инкубирования в среде без сыворотки, стимулировались к пролиферации добавлением сыворотки с ³H₂O в концентрациях 0.008, 0.016, 0.033 и 0.066 МБк/мл. Через 28 ч клетки сни-мали раствором Версена. Одну часть клеточной суспензии анализировали на проточном цитометре, а другую — на сцинтилляционном счетчике для определения включения трития в ДНК. Результаты радиометрического анализа не зарегистрировали включения трития в ДНК клеток, инкубированных в среде с ³H₂O. Цитометрическая оценка клеточной популяции выявила дозозависимую аккумуляцию клеток в S-фазе клеточного цикла (рис. 4, б). С уве-

личением доли клеток в S-фазе снижалась доля клеток как в G₁-, так и в G₂-фазе. При этом снижение доли клеток в G₁-фазе было более существенным, чем в G₂-фазе. При концентрации ³H₂O 0.066 МБк/мл наблюдалось снижение в 2 раза доли клеток с содержанием ДНК 2с.

Иследование активности NO-синтазы. Одним из доводов в пользу того, что линия ECV304 не эндотелиального происхождения, а обладает свойствами опухолевых эпителиальных клеток, был относительно высокий уровень активности NO-синтазы (NOS), свойственный индуцибелльной форме этого фермента. С по-

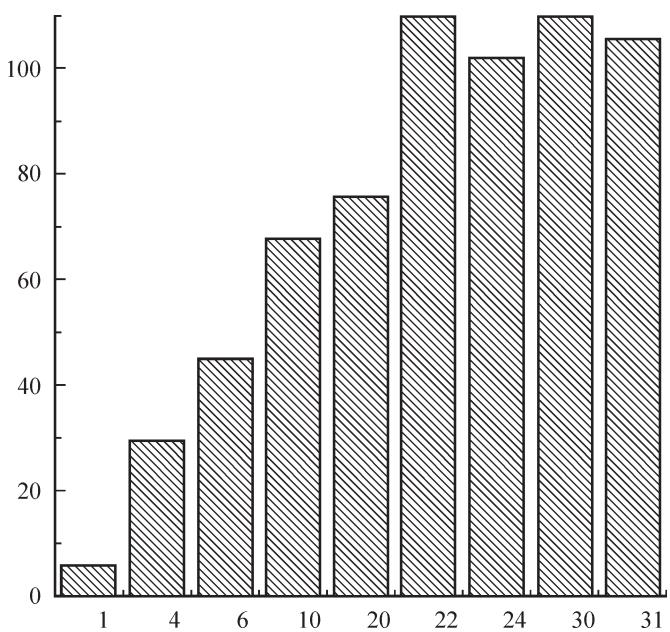


Рис. 3. Кинетика включения [³H]-тимидина в ДНК после смены бессывороточной среды на среду, содержащую сыворотку. По горизонтали — продолжительность инкубации клеток с [³H]-тимидином, ч; по вертикали — то же, что и на рис. 2.

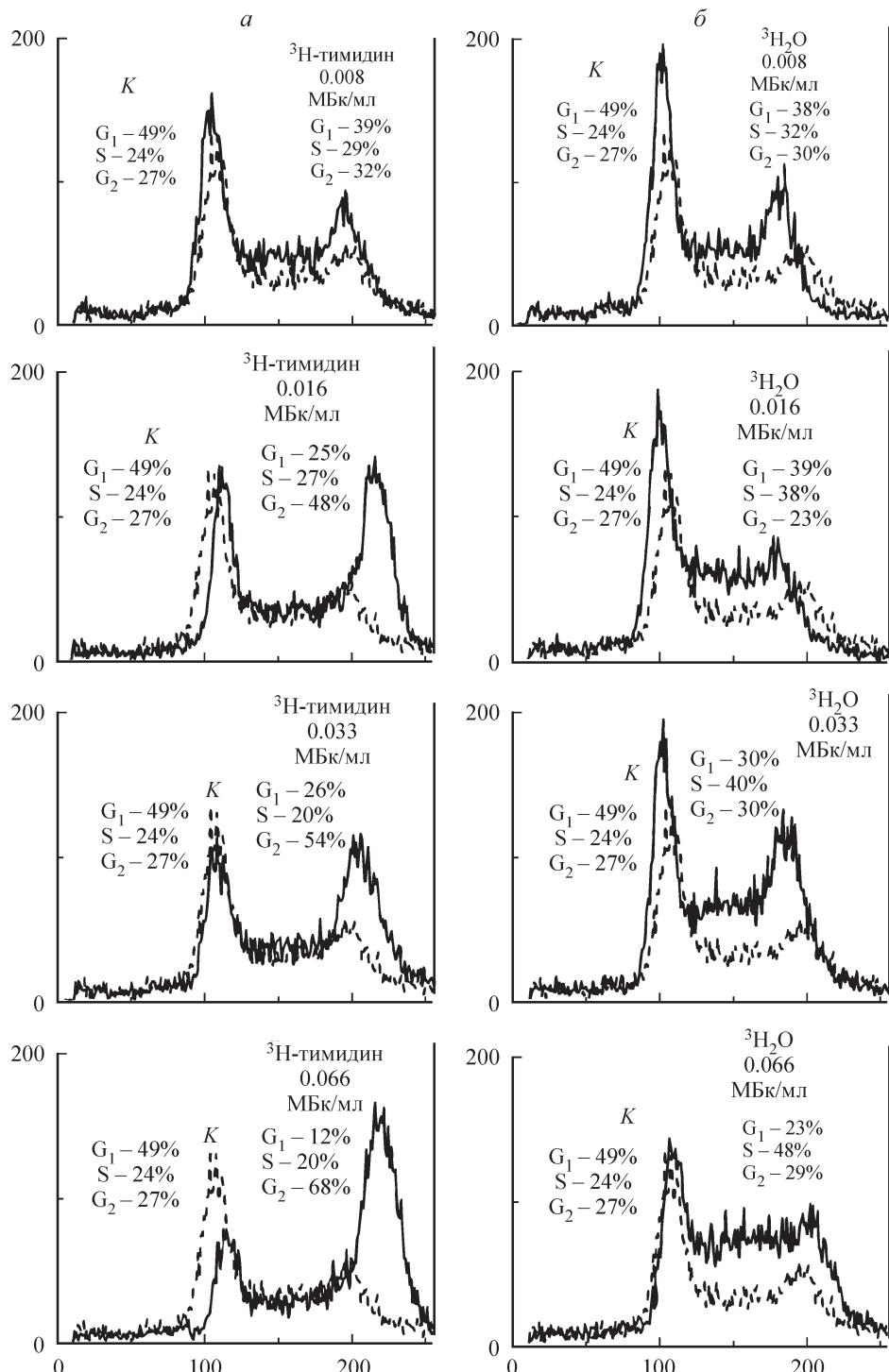


Рис. 4. Распределение клеток по содержанию ДНК (по фазам клеточного цикла) в контроле (*K*, штриховые линии) и через 28 ч инкубации их с $[^{3}\text{H}]$ -тимидином (*a*) или с $^{3}\text{H}_2\text{O}$ (*b*) при возрастающей концентрации изотопа ^{3}H (0.008, 0.016, 0.033 или 0.066 МБк/мл, сплошные линии).

По оси абсцисс — флуоресценция, усл. ед.; по оси ординат — число клеток.

мощью флуоресцентного индикатора NO DAF-2 DA мы провели сравнительное исследование внутриклеточного уровня NO в клетках ECV304 и HeLa. На рис. 5 представлены результаты цитометрического анализа интенсивности флуоресценции клеток после их инкубации с двумя ингибиторами активности NO-синтазы — аминогуанидином (специфическим для индуцибелной изоформы фермента) и L-NAME (неспецифическим ингибитором). Как

видно из гистограммы, интенсивность флуоресценции клеток карциномы человека HeLa была выше, чем клеток ECV304 (рис. 5, *a*). Флуоресценция соответствует уровню NO, поскольку триазольная форма образуется только после взаимодействия диаминофлуоресцина с NO. В тех же клетках, но инкубированных без красителя, сигналы флуоресценции не регистрировались. Обработка клеток HeLa аминогуанидином и L-NAME существенно снижала их

флуоресценцию (рис. 5, б). При этом интенсивность флуоресценции клеток ECV304 не снижалась после их инкубации с L-NAME (рис. 5, в).

Обсуждение

Эндотелиальные клетки играют важную роль в ряде физиологических и патофизиологических процессов, поэтому информация о свойствах и функциях сосудистого эндотелия чрезвычайно важна как для диагностики заболеваний, так и для разработки терапевтических стратегий. Использование в качестве модели исследования перевиваемых иммортализированных линий из эндотелия сосудов человека существенно расширяет эти возможности. Однако культивирование клеток требует специальных питательных сред и сыворотки, и, несмотря на их стандартизацию, почти всегда существуют некоторые различия между партиями даже одной и той же фирмы. Эти различия очень существенны для культивирования как первичных культур, так и для иммортализированных клеточных линий и в меньшей степени — для опухолевых клеточных линий, поскольку способность к пролиферации в отсутствие ростовых факторов является отличительной чертой опухолевых клеток (Hanahan, Weinberg, 2000). Пролиферация исследуемой нами клеточной линии, измеренная по инкорпорации [^3H]-тимидина в ДНК и распределению клеток по содержанию ДНК, явно зависела от наличия сыворотки в питательной среде. Отсутствие сыворотки в питательной среде приводило к блокированию клеток в G₁-фазе клеточного цикла.

Существенным фактором являлась продолжительность инкубации клеток в бессывороточной среде: чем дольше инкубация, тем больше лаг-период до вступления клеток в фазу синтеза ДНК и тем меньшая доля клеток выходит из G₁-блока. Возможно, что после продолжительной инкубации клеток в среде без сыворотки часть клеток переходит в фазу G₀, и блокирование пролиферации происходит в G₀/G₁-фазе. Следует отметить, что 48-часовая инкубация клеток в среде без сыворотки не индуцировала апоптотической гибели клеток. При этом замена эмбриональной сыворотки одной фирмы на таковую другой фирмы или замена эмбриональной сыворотки на сыворотку крупного рогатого скота приводила к появлению апоптотически гибнущих клеток в течение 3 пассажей. Это, скорее всего, свидетельствует о большей чувствительности эндотелия к изменениям сывороточных факторов в среде, чем к их отсутствию. Высокая чувствительность к факторам среды обусловлена, по-видимому, физиологической («барьерной») функцией эндотелия. Кроме того, для эндотелиальных клеток показано, что сывороточное голодание индуцирует освобождение растворимого медиатора или медиаторов, которые определяют резистентность к апоптозам (Raymond et al., 2002). Возможно также, что продолжительность инкубации в бессывороточной среде была недостаточной для индукции апоптоза. Таким образом, для исследуемой нами клеточной линии характерна зависимость пролиферации от содержания сыворотки в отличие от линии ECV304 других авторов (Brown et al., 2000).

Изменение пролиферативных свойств клеток является одной из первых клеточных реакций в ответ на действие факторов как физической, так и химической природы. Для оценки клеточной пролиферации широко применяется радиометрический метод с использованием меченых

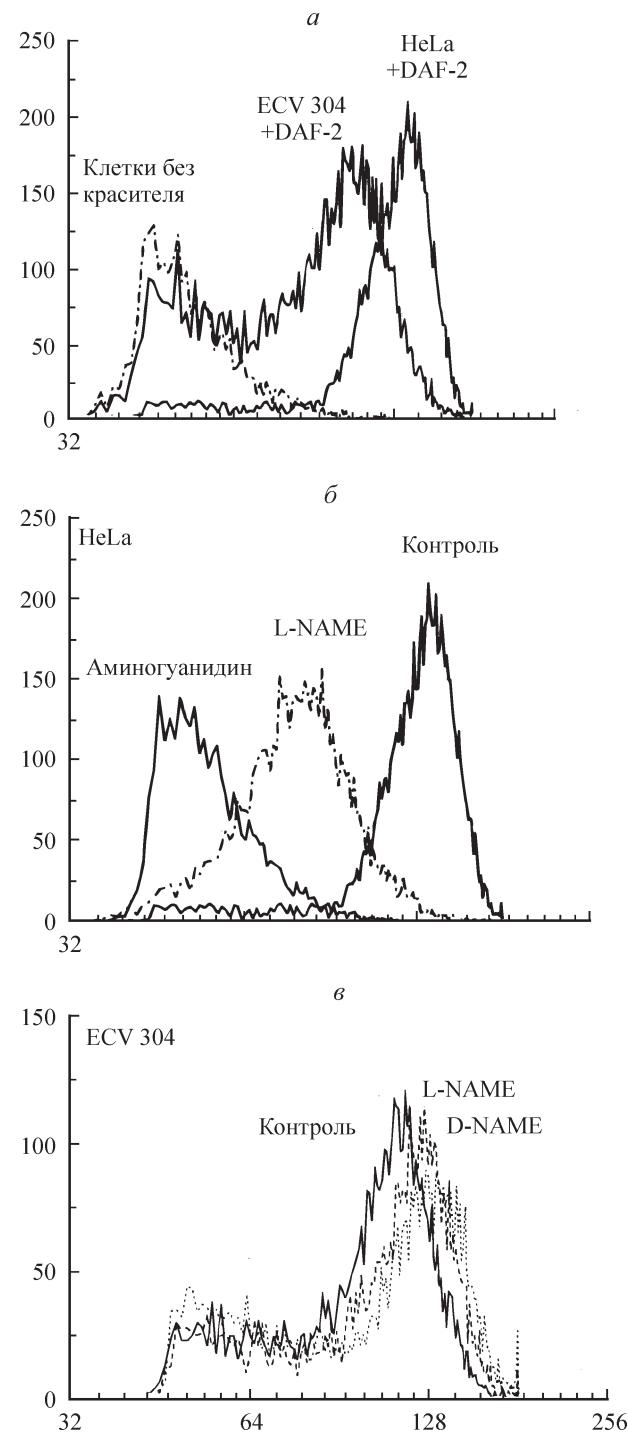


Рис. 5. Спектры зеленой флуоресценции, обусловленной триазолфлуоресцином (DAF-2 T), образовавшимся через 15 мин инкубации клеток с 0.5 мкг/мл DAF-2 DA.

По оси абсцисс — флуоресценция, усл. ед. (логарифмический масштаб); по оси ординат — число клеток. а — сравнительная флуоресценция клеток ECV304 и HeLa; б — влияние ингибиторов NO-синтазы (аминогуанидина, L-NAME) на флуоресценцию клеток HeLa; в — влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME и его неактивного изомера D-NAME на флуоресценцию клеток ECV304.

либо [^3H]-, либо [^{14}C]-предшественников ДНК или РНК. Ранее предполагалось, что низкие концентрации изотопа безопасны, поскольку концентрации меченого [^3H]-тимидина, обычно используемые для исследования метаболической активности (от 20 до 400 МБк/мл), не индуцируют

заметной гибели клеток. Однако появился целый ряд исследований, в которых показано, что инкорпорированные в клетку низкоэнергетические источники β -частиц вызывают фрагментацию ДНК (Solary et al., 1992), экспрессию белка p53 (Dover et al., 1994; Yeargin, Haas, 1995), нарушения в продвижении клеток по циклу и апоптоз (Yanokura et al., 2000; Hu et al., 2001, 2002). Мы использовали концентрацию [^3H]-тимицина (0.066 МБк/мл) для оценки пролиферативных особенностей клеток ECV304 и обнаружили существенные нарушения прогрессии клеток по фазам клеточного цикла.

Цитометрический анализ состава клеточной популяции показал, что инкубация клеток с [^3H]-тимицином приводит к аккумуляции клеток в G_2 -фазе клеточного цикла. Радиометрический анализ клеточной суспензии подтвердил блокирование клеток в G_2 -фазе клеточного цикла. Аккумуляция клеток в G_2 -фазе клеточного цикла носила дозозависимый характер, что еще раз подчеркивает неоднозначность выводов о пролиферативных особенностях клеток ECV304, сделанных на основании только радиометрических исследований. Сам факт блокирования клеток в G_2 -фазе свидетельствует о том, что эта клеточная линия сохранила систему контроля за прогрессией клеток по циклу, не свойственную опухолевым клеткам.

Ранее нами было показано, что облучение клеток ECV304 β -частицами приводит к дозозависимому ингибированию митотической активности и повышению уровня хромосомных повреждений. Очевидно, что повреждения наследственных структур клетки в значительной степени и определяют блокирование прогрессии эндотелиоцитов в G_2 -фазе. Предполагается, что высокая генотоксичность β -частиц обусловлена в первую очередь тем, что [^3H]-тимицин инкорпорируется в ДНК клеток и β -частицы, испускаемые при распаде трития, возникают непосредственно в чувствительной мишени (ДНК) (Гильяно и др., 2007а). На лимфоцитах периферической крови человека также показана связь между задержкой клеток в G_2 -фазе клеточного цикла и репарацией хромосомных повреждений (Durante et al., 1999). Предполагается, что инкорпорированные источники β -излучения могут глобально менять клеточные ответы, изменяя клеточный цикл, метаболическую активность, сигнальную трансдукцию и редоксный статус (Marko et al., 2003).

При сравнении эффективности инкорпорированного источника β -излучения [^3H]-тимицина и β -частиц, испускаемых при распаде трития в составе $^3\text{H}_2\text{O}$, мы обнаружили, что инкубирование клеток в среде с $^3\text{H}_2\text{O}$ приводило к аккумуляции клеток в S-фазе. Накопление клеток в S-фазе носило концентрационно-зависимый характер и сопровождалось снижением доли клеток как в G_1 -, так и в G_2 -фазе клеточного цикла. Снижение доли клеток в G_1 -фазе свидетельствует о том, что обработка клеток $^3\text{H}_2\text{O}$ не нарушила перехода клеток из G_1 - в S-фазу, в то время как снижение доли клеток в G_2 -фазе позволяет предположить, что обработка клеток $^3\text{H}_2\text{O}$ нарушила переход клеток из S-фазы в G_2 -фазу. Проведенный нами ранее радиометрический анализ также показал, что культивирование клеток в среде с $^3\text{H}_2\text{O}$ приводит к дозозависимому снижению включения меченого тимицина (Гильяно и др., 2007б).

Таким образом, изучаемая нами клеточная линия имеет еще одну сверочную точку в S-фазе, которая индуцируется низкими дозами неинкорпорированного источника β -частиц ($^3\text{H}_2\text{O}$), причем обработка клеток β -частицами независимо от положения источника, как и сывороточное

голодание, не блокирует перехода клеток из G_1 - в S-фазу. Аккумуляция клеток в фазе синтеза ДНК может быть обусловлена рядом причин, в основе которых лежат различные механизмы: это и коллизии репликативных ферментов с повреждениями ДНК, которые могут приводить к блокированию репликативной вилки, и нарушение сигнальной трансдукции.

Показано, что ионизирующее излучение индуцирует потерю белка Cdc25A, предотвращая дефосфорилирование Cdk2, что приводит к блокированию репликации ДНК. Фосфатаза Cdc25A активирует циклинзависимую киназу 2 (Cdk2), необходимую для синтеза ДНК, но становится деградированной из-за повреждений ДНК или застороженной репликации (Falck et al., 2002; Sorensen et al., 2003). Оценка механизмов аккумуляции клеток в S-фазе, индуцированной β -частицами, испускаемыми тритием в составе молекулы воды, требует дальнейших исследований. Целью же настоящей работы было выявление способности данной клеточной линии отвечать на неблагоприятные воздействия. Цитометрическая и радиометрическая оценки пролиферативных характеристик линии ECV304 выявили возможность модификации пролиферативного процесса как минимум в трех фазах клеточного цикла (G_1 , S и G_2/M). Сверочная точка G_1/S отсутствует, что согласуется с наличием делеции хромосомы 9 в локусе p21 и нашим предположением об отсутствии гена INK4A/ARF и супрессорных белков p16^{INK4A} и p14^{ARF}.

Известно, что в клетках млекопитающих при окислении азота аминогруппы гуанидинового фрагмента L-аргинина образуется L-цитрулин + NO. Эта реакция протекает при участии как конститутивных (cNOS), так и индуцибелльной (iNOS) изоформ NO-синтазы (Moncada et al., 1991). Несмотря на то что все изоформы NO-синтаз имеют сходную специфическую активность, количество NO, генерируемого на клетку cNOS изоформами, ниже, чем iNOS, и продолжительность генерации NO короче (Mink, Mitchell, 1998). Индуцибелльная NO-синтаза экспрессируется в клетках после воздействия как определенных цитокинов, так и ряда других агентов, в том числе и низких доз ионизирующего излучения. Высокий уровень экспрессии этого ферmenta представлен в ряде опухолевых клеток (Меньшикова и др., 2000). Доля клеток эндотелиального происхождения, экспрессирующих одну из конститутивных форм NO-синтазы — эндотелиальную (eNOS), характерен низкий уровень генерации NO. Проведенные нами измерения внутриклеточного уровня NO показали, что исследуемая нами клеточная линия продуцирует значительно более низкий уровень NO, чем клетки карциномы человека линии HeLa, который не модифицировался L-NAME. В клетках HeLa и аминогуанидин, и L-NAME существенно снижали уровень NO. Аминогуанидин является специфическим ингибитором активности iNOS, тогда как относительно специфичности действия L-NAME данные противоречивы. Показано, что он может ингибировать активность всех трех изоформ NO-синтазы (Furfine et al., 1997). Результаты наших исследований действия ингибитора L-NAME отличаются от результатов других авторов (Brown et al., 2000); это может быть обусловлено рядом причин, в том числе и используемыми методами.

Таким образом, результаты исследований показали, что клетки нашей линии ECV304 отличаются от клеток рака мочевого пузыря T24 как по кариотипическим, так и по некоторым функциональным характеристикам. В первой части нашего исследования с помощью окрашивания хромосом на G-диски было показано, что кариотип иссле-

дуемой нами линии ECV304 отличается от кариотипа клеток линии T24 (Harding et al., 2002) как по модальному числу хромосом, так и по составу структурных перестроек хромосом (Ярцева, Федорцева, 2008). Ее кариотип характеризуется множественными перестройками хромосом, среди которых выявлена парная делеции хромосома del(9)(p21). В локусе 9p21 локализован ген INK4A/ARF (Roussel, 1999), который в клетках исследуемой нами линии может отсутствовать в результате делеции. Продукты этого гена — супрессорные белки p16^{INK4A} и p14^{ARF}. Оба белка связаны с блокированием пролиферации и нарушением перехода клеток из G₁- в S-фазу клеточного цикла.

Во второй части показано, что пролиферативный пул этой линии зависит от присутствия ростовых факторов: отсутствие сыворотки в питательной среде приводит к блокированию клеток в G₁-фазе клеточного цикла, что не свойственно опухолевым клеточным линиям. Под воздействием неблагоприятных факторов физической природы β-частицы, испускаемые при распаде трития, в этой клеточной линии включаются сигнальные системы, блокирующие прогрессию клеток по циклу, что также не свойственно опухолевым клеточным линиям. В клетках ECV304 регистрировался относительно низкий уровень NO, продуцируемый конститутивной формой эндотелиальной NO-синтазы, который не модифицировался ингибиторами индуцибельной NO-синтазы. Исходя из вышеизложенного мы полагаем, что клетки нашей линии ECV304 сохранили свойства исходной, спонтанно трансформированной, клеточной линии, полученной из эндотелиальных клеток пуповинной вены человека (HUVEC) и могут быть использованы в качестве модельной системы для дальнейших исследований свойств сосудистого эндотелия.

Авторы выражают благодарность Е. Г. Бикинеевой и С. И. Степанову за техническое содействие в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49261).

Список литературы

- Гильяно Н. Я., Коневега Л. В., Степанов С. И., Семенова Е. Г., Носкин Л. А. 2007а. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре β- и γ-излучением от инкорпорированных и внешних источников. G₂-блок, индуцированный β-частицами ³H-тимидина и γ-квантами ¹³⁷Cs. Радиационная биология. 47 : 108—116.
- Гильяно Н. Я., Коневега Л. В., Степанов С. И., Семенова Е. Г., Носкин Л. А. 2007б. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре β-излучением от инкорпорированных и внешних источников. S-блок, индуцированный β¹-частицами ³H₂O. Радиационная биология. Радиоэкология. 47 : 151—157.
- Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Рейтров В. П. 2000. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях. Биохимия. 65 : 485—503.
- Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. I. Множественные хромосомные перестройки в клетках ECV304. Цитология. 50 (7) : 000—000.
- Brown J., Reading S. J., Jones S., Fitchett C. J., Howl J., Martin A., Longland C. L., Michelangeli F., Dubrova Y. E., Brown C. A. 2000. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. Lab. Invest. 80 : 37—45.
- Dean P. N., Cray J. W., Dolbeare F. A. 1982. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. Cytometry. 3 : 188—195.
- Dover R., Jayaram Y., Patel K. et al. 1994. p53 expression in cultured cells following radioisotope labeling. J. Cell Sci. 107 : 1181—1184.
- Drexler H. G., Quentmeier H., Dirks W. G., Mac Leod R. A. 2002. Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for epithelial cells. In Vitro Cell Develop. Biol. Anim. 38 : 185—186.
- Durante M., Furusawa Y., Majima H. et al. 1999. Association between G₂-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes. Radiat. Res. 151 : 670—676.
- Falck J., Petrini J. H., Williams B. R., Lukas J., Bartek J. 2002. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. Nat. Genet. 30 : 290—294.
- Furfine E. S., Carbine K., Bunker S., Tanoury G., Harmon M., Laubach V., Sherman P. 1997. Potent inhibition of human neuronal nitric oxide synthase by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester results from contaminating N(G)-nitro-L-arginine. Life Sci. 60 : 1803—1809.
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. 100 : 57—70.
- Harding M. A., Arden K. C., Gildea J. W., Gildea J. J., Perlman E. J., Viars C., Theodorescu D. 2002. Functional genomic comparison of lineage-related human bladder cancer cell lines with differing tumorigenic and metastatic potentials by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and a novel method positional expression profiling. Cancer Res. 61 : 6981—6989.
- Hu V. W., Heikka D. S., Dieffenbach P. B. 2001. Metabolic radiolabeling: experimental tool or Trojan horse? (35)S-Methionine induces DNA fragmentation and p53-dependent ROS production. FASEB J. 15 : 1562—1568.
- Hu V., Black G., Torres-Duarte A. et al. 2002. ³H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. FASEB J. 16 : 1456—1457.
- Hughes S. E. 1996. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304; use in an *in vitro* model of angiogenesis. Exp. Cell Res. 225 : 171—185.
- Marko N., Dieffendach P., Yan G. et al. 2003. Does metabolic radiolabeling stimulate the stress response? Gene expression profiling reveals differential cellular responses to internal beta vs. external gamma radiation. FASEB J. 17 : 1470—1486.
- Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43 : 109—142.
- Nagano T. 1999. Practical methods for detection of nitric oxide. Luminescence. 14 : 283—290.
- Raymond M. A., Vigneault N., Luyckx V., Heber M. J. 2002. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. : 261—269.
- Roussel M. F. 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. Oncogene. 18 : 5311—5317.
- Solary E., Bertrand R., Jenkins J. et al. 1992. Radiolabeling of DNA can induce its fragmentation in HL-60 human promyelocytic leukemic cells. Exp. Cell Res. 203 : 495—498.
- Sorensen C. S., Syljuasen R. G., Falck J., Schroeder T., Ronstrand L., Khanna K. K., Zhou B. B. 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. Cancer Cell. 3 : 247—258.
- Stepanov S. I., Konyshhev V. N., Kotlovanova L. V. et al. 1996. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. Cytometry. 23 : 279—283.
- Suda K., Rothen-Rutishauser B., Gunthert M., Wunderli-Allen-Schach H. 2002. Phenotypic characterization of human umbilical

vein epithelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 38 : 185—186.

Wink D. A., Mitchell J. B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25 : 434—456.

Yanokura M., Takase K., Yamamoto K. et al. 2000. Cell death and cell-cycle arrest induced by incorporation of [³H]thymidine into haemopoietic cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 : 295—303.

Yeargin J., Haas M. 1995. Elevated levels of wild-type p53 induced by radiolabeling of cells leads to apoptosis or sustained growth arrest. *Curr. Biol.* 5 : 423—431.

Поступила 9 I 2008

CHARACTERISTICS OF THE SPONTANEOUSLY TRANSFORMED HUMAN ENDOTHELIAL CELL LINE ECV304. II. FUNCTIONAL RESPONSES OF THE ECV304 CELLS

N. Ya. Giliano,¹ [E. G. Semenova],² R. F. Fedortseva,³ L. V. Konevega¹

¹ Petersburg B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics RAS, Gatchina, ² Institute of Cytology RAS and ³ All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg;

¹ e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

Functional responses of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304 were studied in order to assess its applicability as an endothelial cell model for studying angiogenesis and signal transduction. The dependence of proliferation activity of this line on the presence of growth factor was shown. The absent serum in culture medium resulted in blocking of cells in G₁-phase of a cell cycle which is not typical for tumor cell lines. Low doses of beta particles emitted during [³H]thymidine decay resulted in blocking the proliferation of these cells in G₂M-phase in a dose-dependent manner. Incubation of the cells with another source of beta particles, ³H₂O, under condition of equal specific activities of tritium resulted in preferable accumulation of the cells in S-phase. The different efficiency of beta particles of tritium as a part of ³H₂O molecule or thymidine demonstrates that various mechanisms are responsible for various check points. The check point of G₁/S is absent and that complies with the presence of deletion of chromosome 9 in locus p21. The level of NO produced by constitutive form of NO-synthase in ECV304 cells was relatively low and not modified by inducible NO-synthase inhibitors. The data obtained suggest that ECV304 line cells retained the properties of the initial spontaneously transformed cell line obtained from human umbilical vein (HUVEC) as well as they can be used as a model system for further studies of the properties of vascular endothelial.

Key words: ECV304, proliferation, G₁, S/G₂, G₂/M, beta particles, flow cytometry.