

## АЛЬФА-ЛИПОВАЯ КИСЛОТА ВЫЗЫВАЕТ ИЗБИРАТЕЛЬНУЮ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК С ПОЛИМОРФНЫМИ ЯДРАМИ В КУЛЬТУРЕ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© О. П. Кисурина-Евгеньева, Г. Е. Онищенко

*Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;  
электронный адрес: evgengeva@mail.ru*

Кожа часто подвергается воздействию различных факторов, вызывающих патологическую пролиферацию клеток, нарушение митотического деления и опухолевую трансформацию клеток. Антиоксиданты способны вызывать избирательную гибель таких трансформированных клеток. Целью данной работы являлось исследование воздействия антиоксиданта альфа-липоевой кислоты (ЛК) на клетки эпидермоидной карциномы человека А431. Показано, что, используя различные концентрации (100, 200, 300 и 500 мкМ) ЛК и различное время воздействия (24, 48 и 72 ч), можно замедлить пролиферацию или стимулировать апоптотическую гибель клеток А431. В процессе гибели прежде всего происходит элиминация клеток с полиморфными ядрами (микроядра, ядра, имеющие «почки», гигантские ядра). Электронно-микроскопическое исследование показало, что клетки с нормализованным ядерным фенотипом (при действии 200 мкМ ЛК, 48 ч) имеют ультраструктуру, сходную с контролем. В целом воздействие альфа-липоевой кислотой не только вызывает гибель трансформированных клеток А431, но и активирует механизм элиминации клеток с нарушенным хромосомным составом.

**Ключевые слова:** альфа-липоевая кислота, эпидермоидная карцинома, апоптоз, p53.

**Принятые сокращения:** АИ — апоптотический индекс, АФК — активные формы кислорода, ЛК — альфа-липоевая кислота, МИ — митотический индекс.

Клетки организма человека постоянно подвергаются воздействию активных форм кислорода (АФК), которые являются побочными продуктами окислительно-восстановительных реакций либо образуются при воздействии экзогенных факторов, в том числе ультрафиолетового облучения (Thannickal, Fanburg, 2000; Droge, 2001; Чеснокова и др., 2006). Основным внутриклеточным источником АФК служит митохондриальная цепь переноса электронов. Присутствуя в клетке в небольших количествах, АФК участвуют в сигнальных каскадах (Papa et al., 2006). Избыточное образование и накопление АФК приводят к окислительному стрессу (Thannickal, Fanburg, 2000; Valko et al., 2006), в результате которого происходят повреждения таких структурных компонентов клеток, как липиды мембран, белки и ДНК.

Контроль уровня АФК и защиту клеток от их повреждающего воздействия в условиях стресса осуществляют антиоксидантные системы (Чеснокова и др., 2006; Valko et al., 2006). В них входят несколько клеточных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза, а также пул низкомолекулярных соединений, обладающих антиоксидантной активностью, — аскорбиновая кислота, глутатион, цистеин, альфа-липоевая кислота (ЛК) и токоферолы. Эти молекулы ликвидируют АФК. Такие заболевания, как диабет, атеросклероз, нейродегенеративные и онкологические заболевания, сопровождаются нарушением внутриклеточного баланса АФК. Поэтому антиоксиданты давно используются в качестве поддерживающей терапии ряда заболеваний.

В последние годы обнаружено, что некоторые из этих веществ способны вызывать гибель опухолевых клеток, не влияя на выживание нормальных клеток (Marsh et al., 2005). Более того, антиоксиданты, такие как, например, токоферол (витамин Е), могут нормализовать фенотип определенных трансформированных клеток (рака молочной железы) (You et al., 2001).

Одним из важнейших внутриклеточных антиоксидантов является ЛК, которая синтезируется в митохондриях. Встречающаяся в природе форма ЛК имеет R-конфигурацию. Однако в медицине и косметологии чаще всего применяется смесь натуральной и синтетической форм. Попав в клетку, экзогенная ЛК редуцируется до дигидролипоевой кислоты, которая также является мощным антиоксидантом. ЛК характеризуется высокой реактивностью по отношению как к свободным радикалам, так и к восстановлению других антиоксидантов (Levy et al., 1993; Bilska, Wtodek, 2005; Hultberg, Hultberg, 2006). Много исследований посвящено антиоксидантным свойствам ЛК, и только немногие демонстрируют ее прооксидантные свойства, которые и обеспечивают включение программы гибели опухолевых клеток (Sakatay, 2006).

В работе было проведено изучение влияния экзогенной ЛК на процессы пролиферации и гибели клеток культуры А431 (ороговевшей эпидермоидной карциномы человека). Данная культура используется в качестве модельной системы для исследования различных аспектов онкологических заболеваний эпидермиса. Клетки кожных

покровов чаще других клеток организма подвергаются различным воздействиям, способным вызвать не только повреждения, но и привести к трансформации клеток эпидермиса и дермы. Целью работы было выяснить, какое влияние (стимулирующее или угнетающее) могут оказать природные антиоксиданты, такие как ЛК, на спонтанно возникшие трансформированные клетки.

### Материал и методика

Клетки культуры A431 (ороговевающей эпидермоидной карциномы человека) выращивали на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (РАА Laboratories, Австрия), 2 мМ L-глутамин и 80 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С. Через 24 ч после посадки в среду культивирования добавляли натриевую соль R-формы ЛК (Labochim, Италия) до конечных концентраций 100, 200, 300 и 500 мкМ.

Подсчет митотического (МИ) и апоптотического (АИ) индексов и числа клеток с полиморфными ядрами (клетки с микроядрами, с ядрами неправильной формы, гигантскими ядрами) проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для иммуноцитохимических исследований клетки фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида (Polyscience, США), приготовленным на буфере PBS (Sigma, США, 0.01 М, pH 7.4). Препараты окрашивали мышинными моноклональными антителами к белку p53 (Sigma США, BP53-12, P5813), моноклональными антителами к каспазе 3 (Sigma, США, C8487), моноклональными антителами к цитохрому c (Sigma, США, C5723). В качестве вторых антител использовали соответственно антитела против IgG мыши, конъюгированные с FITC (Sigma, США, F9006), антитела против IgG кролика, конъюгированные с FITC (Sigma, США, F7512), и антитела против IgG овцы, конъюгированные с FITC (Sigma, США, F5137). Для выявления АФК в среду добавляли 2', 4'-дихлорофлуоресцеиндиацетат (BioChemika, США) на 20 мин. В присутствии АФК в клетке образуется флуоресцирующий продукт окисления дихлорофлуоресцеин. Фотосъемку производили на микроскопе Axiovert M200.

Для ультраструктурного анализа клетки A431 фиксировали 2.5%-ным глутарным альдегидом (Sigma, США). Постфиксацию проводили 1%-ым раствором OsO<sub>4</sub> в течение 1 ч. Далее клетки на стеклах обезвоживали и заливали в Эпон 812 (Fluka, США) по стандартной методике. Анализ материала проводили на серийных срезах толщиной 50—80 нм, которые контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и исследовали при помощи электронного микроскопа JEM-100B.

Использованные реактивы: среда DMEM, L-глутамин, гентамицин (ПанЭко, Россия), эмбриональная сыворотка (РАА Laboratories, Австрия), натриевая соль R-формы ЛК (Labochim, Италия), буферный раствор PBS (Sigma, США), параформальдегид (Polyscience, США), глутарный альдегид (Sigma, США), Эпон 812 (Fluka, США) и 2', 4'-дихлорофлуоресцеиндиацетат (BioChemika, США).

### Результаты

Индексы МИ и АИ — широко используемые параметры оценки состояния клеток в культуре, позволяющие получить информацию об интенсивности пролиферации и

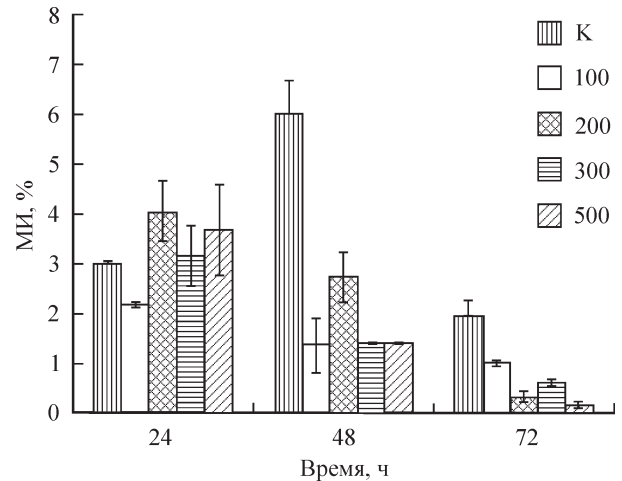


Рис. 1. Подавление альфа-липоевой кислотой митотической активности в культуре клеток эпидермоидной карциномы A431.

МИ — митотический индекс, К — контроль, 100, 200, 300 и 500 — соответствующие концентрации (мкМ) альфа-липоевой кислоты.

гибели клеток. В контроле МИ клеток культуры эпидермоидной карциномы A431 составляет от 2.6 до 6.4 % в 1-е и 2-е сут культивирования (рис. 1). При достижении состояния монослоя через 72 ч культивирования МИ снижается до 1.98 %. Воздействие ЛК во всех испытанных концентрациях вызывает достоверное снижения МИ только на 2-е сут культивирования. На 3-и сут воздействия МИ уменьшается до 1.05 % (100 мкМ ЛК), 0.39 % (200 мкМ ЛК) или 0.69 % (300 мкМ ЛК). При воздействии 500 мкМ ЛК на стекле остаются одиночные клетки, но при этом в популяции сохраняется митотическая активность (0.22 %).

Подсчет числа апоптотических клеток показал, что в контроле культура клеток A431 характеризуется довольно низким (0.3—0.4 %) АИ (рис. 2). Незначительный (но достоверный) рост числа апоптозов происходит через 48 ч воздействия 200 и 300 мкМ ЛК. Значительное увеличение доли апоптотических клеток происходит на 3-и сут культивирования (8.4 % при 200 мкМ и 11.65 % при

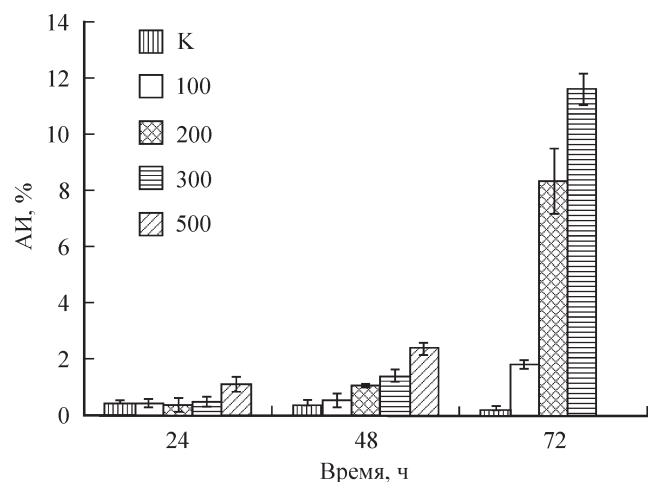


Рис. 2. Индукция апоптоза альфа-липоевой кислотой в клетках культуры эпидермоидной карциномы A431.

АИ — апоптотический индекс; К, 100, 200, 300 и 500 — то же, что и на рис. 1.

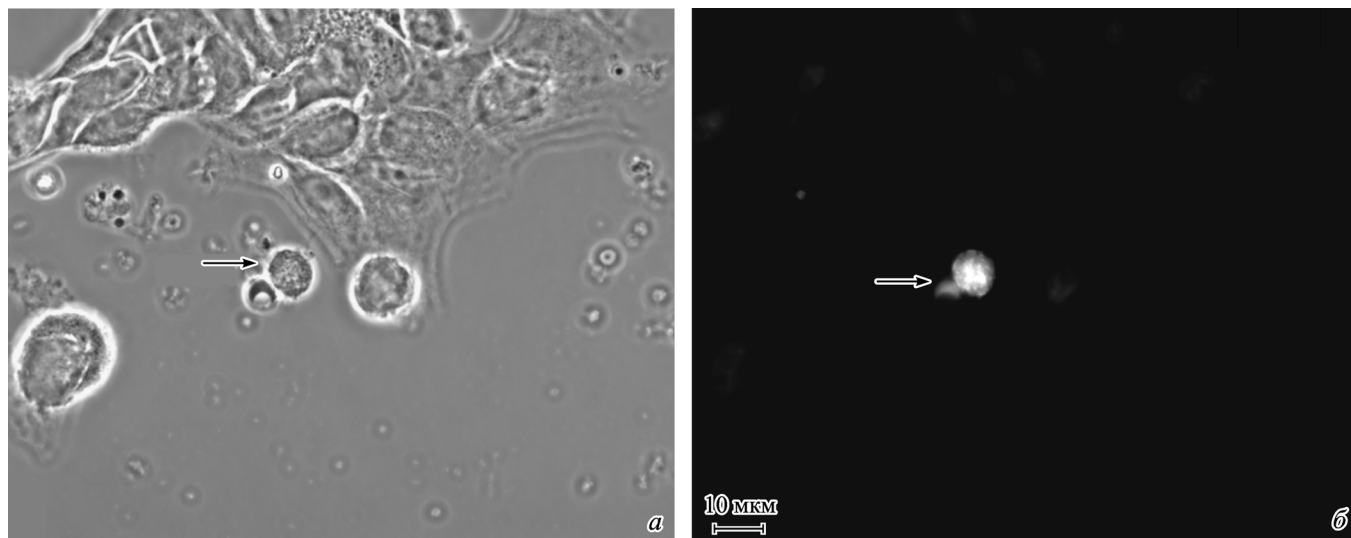


Рис. 3. Активация каспазы 3 и гибель клеток культуры эпидермоидной карциномы A431 при действии альфа-липоевой кислоты. *а* — фазово-контрастное изображение, *б* — окрашивание антителами к каспазе 3. *Стрелка* указывает на апоптотическую клетку.

300 мкМ ЛК). В присутствии 100 мкМ ЛК число апоптозов через 72 ч культивирования составляет 1.86 %. ЛК в концентрации 500 мкМ вызывает массовую гибель клеток через 72 ч. Окрашивание антителами к активной форме каспазы 3 подтверждает апоптотический характер гибели клеток (рис. 3). Активации каспазы 3 предшествует выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму (рис. 4). Причем выход происходит не из всех митохондрий одновременно, часть этих органелл остается интактной.

Клетки культуры A431 характеризуются относительно высоким содержанием в популяции клеток с полиморфными ядрами — от 6.16 до 11.52 %. К полиморфным ядрам относятся ядра, имеющие «почки», микроядра и гигантские полиплоидные ядра. Анализ изменения числа полиморфноядерных клеток в присутствии ЛК выявил

интересную закономерность: воздействие ЛК в концентрациях от 100 до 300 мкМ приводит к значительному снижению доли таких клеток в популяции (рис. 5). Воздействие 200 и 300 мкМ вызывает уменьшение этого показателя до 0.5 % уже через 24 ч культивирования. Через 72 ч культивирования в популяции встречаются лишь единичные полиморфноядерные клетки. Воздействие 100 мкМ ЛК не оказывает столь ярко выраженного эффекта, однако также приводит к значительному снижению доли полиморфноядерных клеток: 4.31 % через 24 ч, 1.4 % через 48 и 1.07 % через 72 ч.

В целом проведенный статистический анализ показал, что использование разных концентраций и разное время воздействия ЛА на клетки культуры A431 (100, 200 и 300 мкМ ЛК, 48 ч) позволяет замедлить пролиферацию

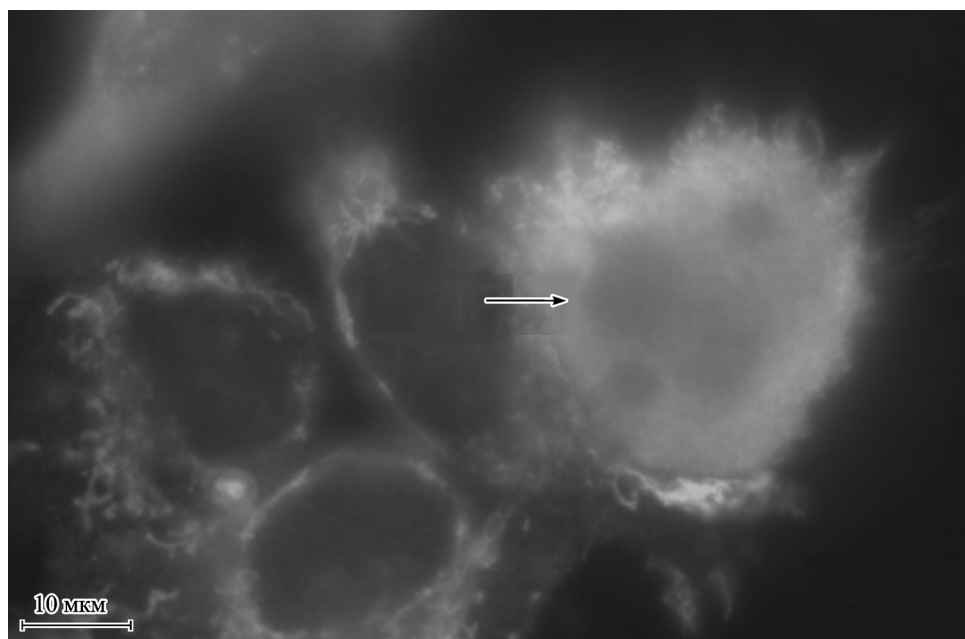


Рис. 4. Выход цитохрома *c* из митохондрий в клетке с микроядрами при действии 200 мкМ альфа-липоевой кислоты. Окрашивание антителами к цитохрому *c*. *Стрелка* указывает на клетку, в которой произошел выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму.

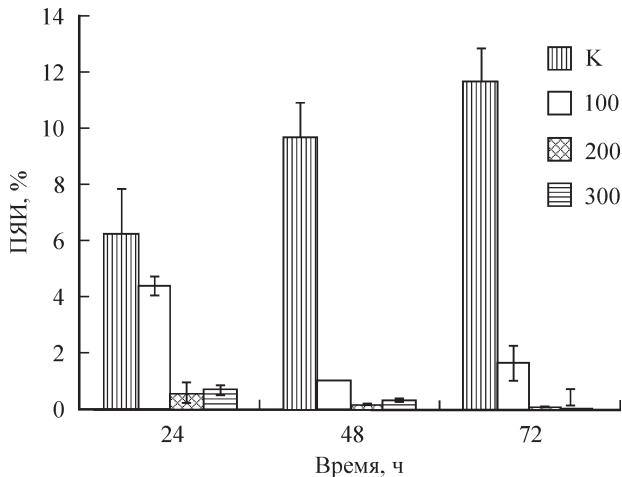


Рис. 5. Снижение числа клеток с полиморфными ядрами в культуре клеток эпидермоидной карциномы А431 при действии альфа-липоевой кислоты.

ПЯИ — полиморфноядерный индекс; К, 100, 200 и 300 — то же, что и на рис. 1.

и активировать программу апоптоза (200 и 300 мкМ ЛК, 72 ч) или «нормализовать» фенотип ядра трансформированных клеток (200 и 300 мкМ ЛК, 24 ч или 100, 200 и 300 мкМ, 48 ч).

Белок p53 является важным регулятором пролиферативной и апоптотической активности клеток млекопитающих. В контроле антитела к белку p53 слабо окрашивают ядра практически всех клеток А431. По-видимому, наблюдаемый нами в клетках А431 уровень экспрессии белка p53 не влияет на пролиферативную активность. Тем не менее встречаются отдельные одноядерные и полиморфноядерные клетки с ярко флуоресцирующими ядрами (рис. 6, а). Кроме того, антитела к p53 окрашивают в цитоплазме сетчатые структуры. Окрашивание клеток культуры MCF7 данными антителами не выявляет цитоплазматическую локализацию p53 (Кисурина-Евгеньева и др., 2006). В присутствии ЛК при сохранении слабой окраски всех ядер наблюдается интенсивное окрашивание полиморфных ядер в части клеток (рис. 6, б). В цитоплазме большинства клеток антителами окрашивалась тонкая сеть, сходная с контролем.

Для того чтобы определить, связана ли элиминация полиморфноядерных клеток с изменением уровня продукции клетками АФК, было проведено окрашивание культуры А431 2', 4'-дихлорофлуоресцеиндиацетатом в контроле и при воздействии ЛА (48 ч, 200 мкМ). Подсчет числа интенсивно флуоресцирующих клеток показал, что при воздействии ЛА происходит значительное увеличение продукции АФК. В контроле флуоресцирующие клетки и клетки, содержащие ярко окрашенные гранулы, составляют  $18.52 \pm 5.44\%$ , в присутствии ЛА —  $44.29 \pm 8.71\%$ . Таким образом, гибель клеток при воздействии данным антиоксидантом связана с увеличением продукции АФК.

В целом обнаружено, что концентрацию ЛК 200 мкМ можно считать нетоксичной для клеток культуры эпидермоидной карциномы А431, но вызывающей в то же время избирательную элиминацию полиморфноядерных клеток.

Для того чтобы точнее оценить состояние клеток при воздействии 200 мкМ ЛК, провели анализ ультраструктуры клеток в контроле и при воздействии 200 мкМ ЛК в течение 48 ч. Прежде всего, проводили анализ морфологии

и локализации митохондрий как органелл, вовлеченных в метаболизм ЛК и являющихся основным источником АФК в клетке. Заметных различий в строении и локализации митохондрий в контроле и в присутствии ЛК не было выявлено (рис. 7). В обоих случаях митохондрии имеют просветленный матрикс и содержат немногочисленные кристы. Аппарат Гольджи представлен плоскими диктосомами, окруженными везикулами, и располагается вблизи ядерной оболочки как в опыте, так и в контроле. Единственным отличием является увеличение числа миелиноподобных телец, содержащих мембранные структуры. Состояние клеточного центра также не претерпевает значительных изменений (рис. 8). От центриолей отходят микротрубочки. Центриоли окружены многочисленными везикулами, на периферии располагаются плоские диктосомы аппарата Гольджи. При воздействии ЛК несколько увеличивается количество лизосом и миелиноподобных телец.

## Обсуждение

При воздействии ЛК на клетки эпидермоидной карциномы А431 мы наблюдаем три основных дозо- и времязависимых эффекта: гибель клеток, замедление пролиферации и нормализация фенотипа ядра.

Гибель клеток. Апоптотическая гибель клеток А431 в присутствии ЛК сопровождается повышением содержания АФК. Согласно данным литературы, механизм индукции гибели клетки при повышении концентрации АФК связан с активацией одного из ферментов MAP-киназного каскада (mitogen-activated protein kinase) — JNK (Jun-N-terminal kinase). Активация данного каскада может опосредоваться рецепторным путем (Papa et al., 2006), а также осуществляться в ответ на окислительный стресс. В последнем случае ключевым ферментом является киназа ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) (Nagai et al., 2007). JNK в свою очередь индуцирует апоптоз по митохондриальному пути, инактивируя антиапоптотические белки Bcl-2 and Bcl-xL и активируя проапоптотические белки Bim и Bmf, Bax, Bak и jBid (Nakano et al., 2006; Papa et al., 2006). Кроме того, основной регулятор клеточного цикла белок p53 также является субстратом для JNK (Jimenez et al., 1999). Система контроля уровня АФК в клетке крайне чувствительна. Даже следовые количества АФК стимулируют повышенное образование в клетке антиоксидантов (Pias, Aw, 2002). Антиоксиданты, в том числе и ЛК, в нетрансформированных клетках ингибируют образование АФК при активации MAP-киназного каскада, препятствуют активации JNK и предотвращают апоптотическую гибель нормальных нетрансформированных клеток (Byun et al., 2005; Nakano et al., 2006). Однако трансформированные клетки реагируют на экзогенные антиоксиданты иначе, чем нормальные. Именно антиоксиданты активируют апоптотическую гибель некоторых вариантов трансформированных клеток, связанную с образованием повышенного количества АФК. Такой неожиданный «прооксидантный» эффект антиоксидантов отмечен для ряда препаратов (Qanungo et al., 2004; Marsh et al., 2005; Sakatay, 2006).

Наши данные подтверждают данные литературы о том, что ЛК может действовать как прооксидант, вызывая гибель клеток за счет индукции образования АФК (Wenzel et al., 2005; Sakatay, 2006; Simbula et al., 2007). В частности, апоптотическая гибель эпителиальных клеток лег-



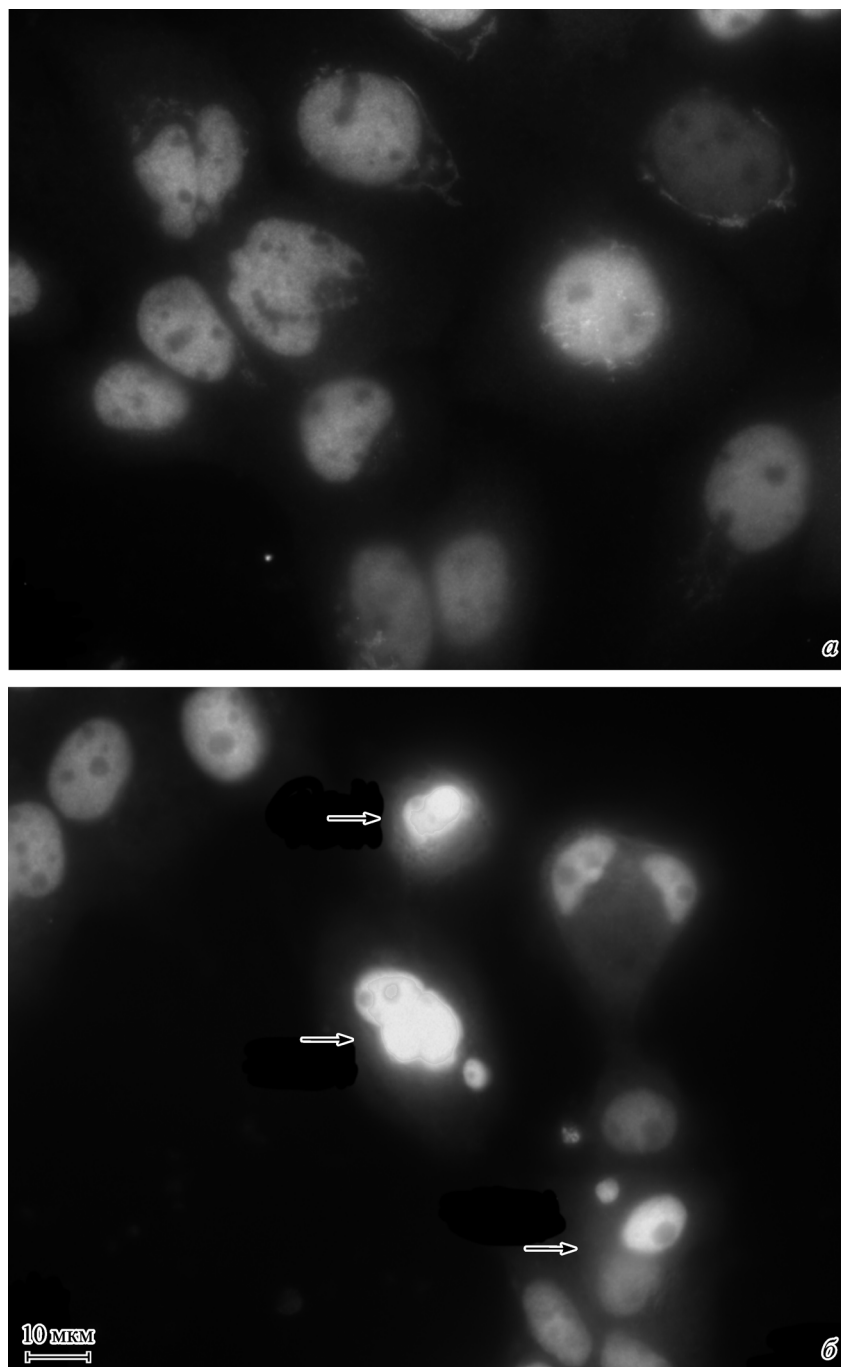


Рис. 6. Локализация белка p53 в ядрах клеток эпидермоидной карциномы A431.

*a* — контроль, 48 ч; *б* — 300 мкМ альфа-липоевой кислоты, 48 ч. Окрашивание антителами к белку p53. Стрелки указывают на полиморфные ядра и микродроза.

кого человека линии H460 при действии ЛК обусловлена именно гиперпродукцией АФК (Moungjaroen et al., 2006). При этом нарушение работы цепи переноса электронов или гиперэкспрессия внутриклеточных антиоксидантов блокирует повышение уровня АФК. Гибель клеток H460 происходит по митохондриальному пути.

Таким образом, можно предположить, что ЛК в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 влияет на работу электронно-транспортной цепи митохондрий, что приводит к увеличению образования АФК, на активацию JNK и индукцию митохондриального пути запуска апоптоза.

**Замедление пролиферации.** Воздействие антиоксидантов на трансформированные клетки не всегда приводит к апоптотической гибели, так как является дозозависимым (Dovinova et al., 1999; Zhang et al., 2007). В частности, для ЛК показано, что в низких концентрациях (1 и 5 мкМ) она усиливает пролиферацию клеток мышечной лейкемии (Van de Mark et al., 2003), а в высоких концентрациях (100 мкМ) подавляет пролиферацию этих клеток. При этом клетки эпидермоидной карциномы обладают большей устойчивостью к воздействию по сравнению с клетками лейкемии (Van de Mark et al., 2003). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ис-

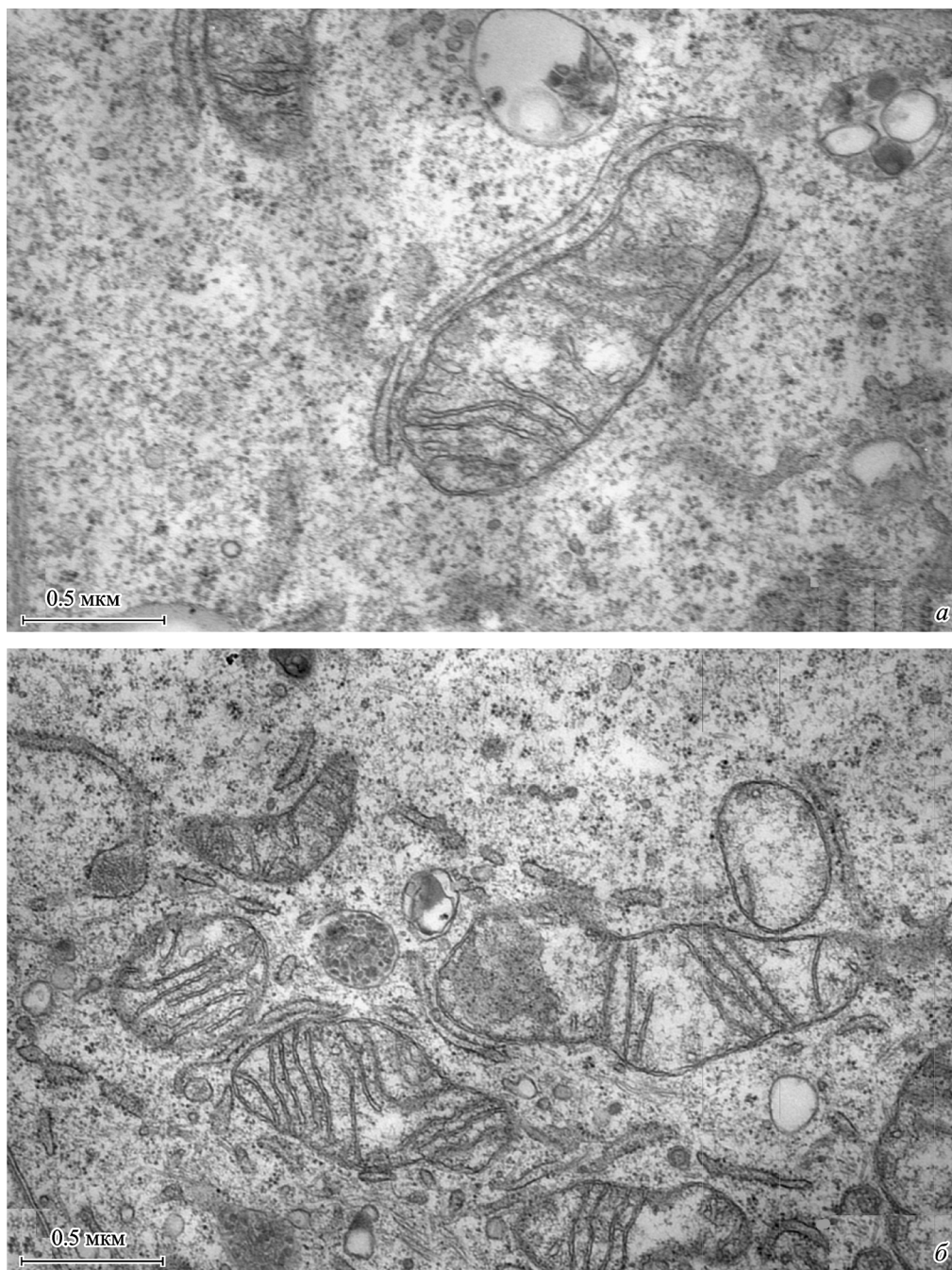


Рис. 7. Митохондрии в клетках эпидермоидной карциномы А431.

*a* — контроль, 48 ч; *б* — 200 мкМ альфа-липоевой кислоты, 48 ч.

пользование разных концентраций и сроков воздействия позволяет достичь либо замедления пролиферации, либо индукции гибели в культуре трансформированных клеток А431.

Задержка пролиферации чаще всего связана с активацией белков-регуляторов клеточного цикла, таких как р53, который в свою очередь активирует р21, являющийся блокатором комплекса циклинов и циклинзависимых киназ G<sub>1</sub>-фазы клеточного цикла. Клетки культуры А431 содержат транскрипционно неактивный р53. Однако в литературе имеются данные о том, что экспрессия р21 в клетках А431 может быть не связана с р53. Так, воздействие УФ приводит к р21-опосредуемой остановке клеточ-

ного цикла, при этом происходит деградация cdk4 и циклинов в протеосомах (Kim et al., 2002).

Задержка пролиферации может быть связана и с антиоксидантными свойствами ЛК. Показано, что ЛК, так же как и бутират натрия (агент, вызывающий остановку клеточного цикла в S-фазе), вызывает гиперацетилирование гистонов. В нормальных клетках происходит остановка клеточного цикла, сопровождаемая активацией и повышением времени полужизни р27Kip. Опухолевые клетки при этом гибнут путем запуска программы апоптоза (Van de Mark et al., 2003).

В целом механизм действия ЛК на клетки А431 еще не изучен. Наблюдаемый многими авторами дозозависи-



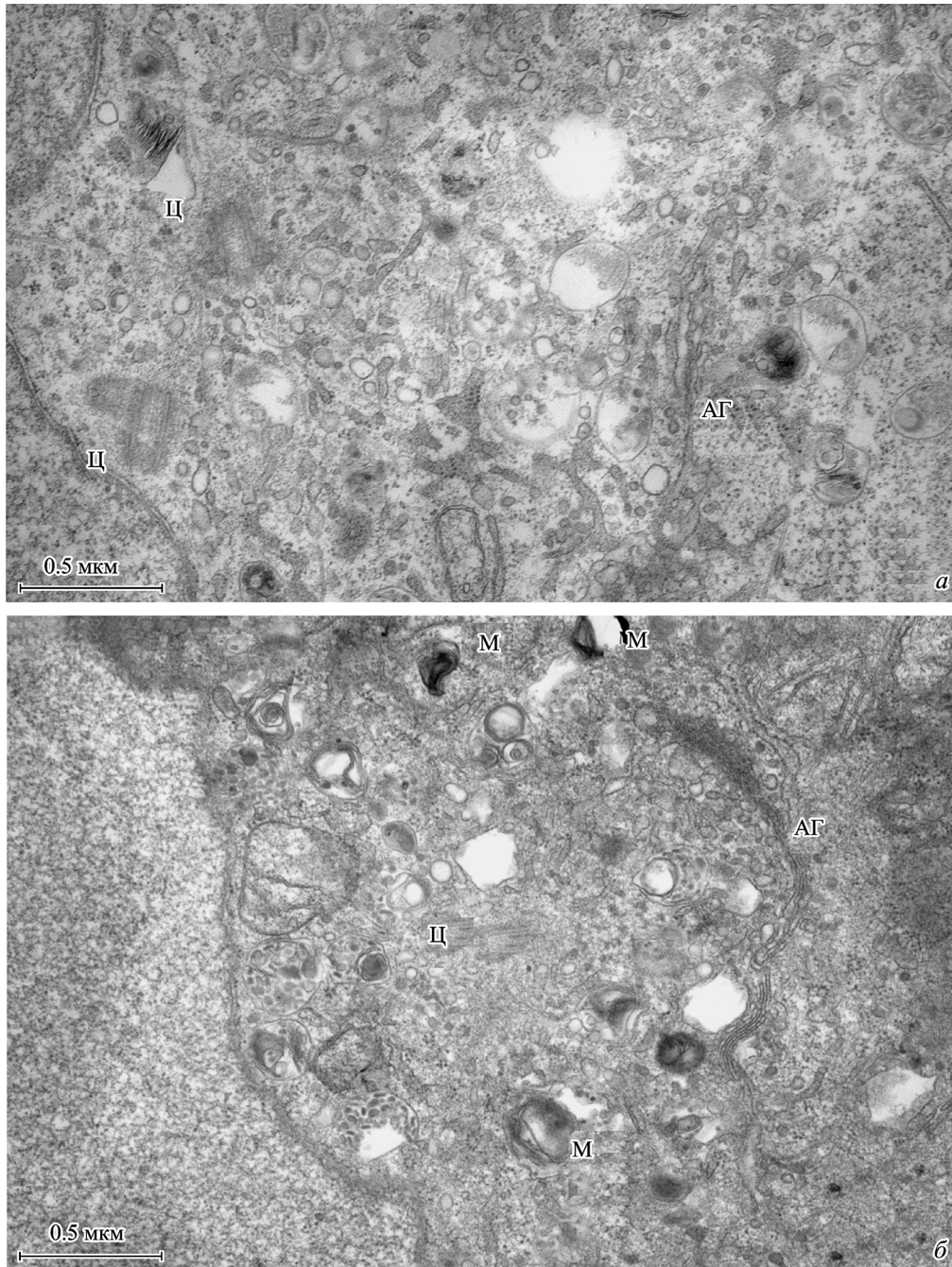


Рис. 8. Клеточный центр в клетках эпидермоидной карциномы А431.

*a* — контроль, 48 ч; *b* — 200 мкМ альфа-липовой кислоты, 48 ч. Ц — центриоль, АГ — аппарат Гольджи, М — миелоноподобные тельца.

мый эффект и неантиоксидантные свойства подтверждают, что принцип действия ЛК является более сложным, чем казалось на первый взгляд.

**Элиминация полиморфноядерных клеток.** Опухолевые клетки различного происхождения характеризуются нестабильностью генома, которая морфологически проявляется в высоком содержании в популяции клеток с микроядрами, полиплоидных клеток, многоядерных клеток и клеток с ядрами неправильной формы (Fenech, 1994; Grady, 2004; Rajagopalan, Lengauer, 2004). Число клеток с микроядрами служит количественным показателем генетической нестабильности. Образование клеток с микроядрами может происходить либо в резуль-

тате нарушения организации веретена деления, либо при нарушении репарации разрывов ДНК.

Нарушения митотического аппарата клетки характерны для многих опухолевых клеток, и патологии деления определяют анеуплоидность опухолевых клеток (Lange, 2002; Weaver, Cleveland, 2006). Поскольку в опухолевых клетках, как правило, нарушается система контроля генома, такие клетки успешно проходят точку проверки клеточного цикла в  $G_1$ -периоде, реплицируют ДНК в S-фазе, проходят  $G_2$ -период и вступают в новый митоз, увеличивая в популяции число клеток с генетическими повреждениями. В отличие от опухолевых клеток нормальные не-трансформированные клетки при изменении числа хро-

мосом в результате их неправильного расхождения в митозе не могут пройти точку проверки в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла. Ведущую роль в этом процессе играет белок p53, являющийся фактором транскрипции белков, останавливающих продвижение по клеточному циклу. При невозможности репарирования p53 активирует транскрипцию проапоптотических генов. Таким образом, белок p53 служит важнейшим регулятором клеточного цикла. В качестве фактора транскрипции он способен в ответ на экзогенные и эндогенные факторы регулировать экспрессию белков-блокаторов клеточного цикла и проапоптотических белков (Agarwal et al., 1998; Haupt et al., 2003). Регуляция активности p53 определяется разнообразными посттрансляционными модификациями (Jimenez et al., 1999).

Клетки культуры A431 характеризуются высокой экспрессией p53, так как имеют 2 копии гена p53 (Park et al., 1994). Гиперэкспрессия p53 часто связана с гиперэкспрессией митотической киназы авроры А. Эта киназа располагается в полюсах веретена деления, и изменение ее экспрессии сопровождается нарушением строения веретена деления и нарушением расхождения хромосом (Guan et al., 2007; Oda-Sato, Tanaka, 2007). Это может объяснить высокое содержание в культуре A431 клеток с полиморфными ядрами.

В литературе существуют отрывочные данные об уменьшении числа клеток с микроядрами в присутствии антиоксидантов. Так, при исследовании влияния N-ацетил-L-цистеина (NAC) на организм курильщиков было отмечено значительное снижение частоты появления клеток, содержащих микроядра, в ротовой полости пациентов, принимавших NAC (Van Schooten, 2002). ЛК также уменьшает образование клеток с микроядрами в костном мозге и в крови в ответ на воздействие адриамицином (Pralathan et al., 2006). Механизм данного воздействия неясен. Наши данные показывают, что элиминация клеток с микроядрами может быть связана с белком p53.

Несмотря на то что клетки культуры A431 характеризуются высокой экспрессией p53, в данной культуре, так же как и во многих опухолях, p53 неактивен в качестве фактора транскрипции, так как содержит мутацию в 273-м кодоне, препятствующую трансактивации (p53-R273H) (Park et al., 1994). Однако в ряде других клеточных линий мутация p53-R273H не препятствует трансактивации p53 (Park et al., 1994). Данные литературы свидетельствуют о том, что p53-R273H может иметь какие-то неизвестные функции, так как в некоторых условиях наблюдаются изменение уровня его экспрессии, активация связанных с ним генов и перераспределение самого белка p53-R273H. Так, имеются данные о том, что мутация p53-R273H сопровождается усилением пролиферации клеток при введении этого мутантного гена в различные клеточные линии (Scian et al., 2004). Экспрессия p53-R273H подавляет экспрессию прокаспазы 3 (Wong et al., 2007). Уровень экспрессии p53-R273H изменяется при нарушении прохождения клеточного цикла. Например, при блокировании клеток A431 в S-периоде происходит снижение экспрессии p53-R273H (Kurose et al., 1995). Уменьшение экспрессии совпадает с блоком тетраплоидных клеток при воздействии доксирубицина (агента, повреждающего ДНК) (Kwok et al., 1994). Уменьшение экспрессии происходит также при воздействии агентов, вызывающих образование АФК, и сопровождается усилением экспрессии p21 (Pan et al., 2005). Полученные нами данные демонстрируют перемещение p53-R273H в

микроядра в ответ на воздействие ЛК, что сопровождается элиминацией этих клеток.

Таким образом, клетки способны изменять уровень экспрессии и перераспределять мутантный p53-R273H в ответ на различные воздействия. Можно высказать предположение о том, что данная мутация p53 не препятствует выполнению им некоторых, возможно нетранскрипционных, функций.

К нетранскрипционным функциям p53 относится его способность индуцировать митохондриальный путь запуска апоптоза, взаимодействуя с белками семейства Bcl (Bcl-xL, Bcl-2, Bak и Bax) (Moll et al., 2005). В клетках A431 антитела к p53 окрашивают в цитоплазме сеть, сходную с митохондриальной сетью, что является косвенным доказательством возможности участия p53-R273H в активации митохондриального пути запуска апоптоза.

Интенсивное окрашивание антителами к p53 полиморфных ядер в клетках A431 также может быть связано с участием p53 в узнавании повреждений и репарации ДНК. В настоящее время описаны некоторые пути регуляции репарации ДНК, в которых участвует p53: nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER) (Kwok et al., 1994; Brash, Havre, 2002; Seo et al., 2002). Влияние мутации p53-R273H на способность p53 участвовать в репарации ДНК не проверялось в данных исследованиях. Таким образом, основываясь на данных литературы, нельзя исключить возможность участия p53 в распознавании поврежденной ДНК в присутствии ЛК. Однако то, каким образом ЛК стимулирует способность p53 транспортироваться в полиморфные ядра, неясно. Известно, что транспорт p53 в ядро опосредуется системой микротрубочек и при их разборке p53 теряет способность перемещаться в ядро (Кисурина-Евгеньева и др., 2006). Можно высказать предположение о том, что ЛК каким-то образом модифицирует систему микротрубочек.

В литературе имеются данные о том, что некоторые соединения (CP-31398) способны восстанавливать транскрипционную активность мутантных p53, в том числе и p53-R273H (Hupp et al., 1995; Weinmann et al., 2008). Однако структурные формулы ЛК и CP-31398 не имеют значительного сходства, и, таким образом, вряд ли ЛК способствует восстановлению транскрипционных функций p53. В целом изучение роли p53-R273H при воздействии ЛК на клетки разных типов требует дальнейших исследований.

Основываясь на полученных нами данных и данных литературы, можно предположить следующую последовательность внутриклеточных реакций, активируемых ЛК. ЛК вызывает образование АФК (механизм неясен). АФК активируют MAP-киназный каскад (возможно, через ASK1) и JNK-киназу. JNK-киназа способна фосфорилировать p53 и вызывать его транслокацию в ядро, где p53 участвует в репарационных процессах. Это в свою очередь может вызывать замедление пролиферации и способствовать уменьшению числа клеток с микроядрами уже через 24 ч воздействия. Восстановление транскрипционной активности p53 при этом представляется нам маловероятной. Длительная активация JNK приводит к запуску митохондриального пути апоптоза и гибели клеток на 3-и сут воздействия ЛК.

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить концентрации ЛК и время воздействия (100 мкМ и 48 ч или 200 мкМ и 24 ч), не являющиеся токсичными и приводящие к нормализации фенотипа ядра в клетках эпидермоидной карциномы A431. В целом воздействие



ЛК не только вызывает гибель трансформированных клеток, но и активирует механизм элиминации клеток с нарушенным хромосомным составом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00750).

### Список литературы

- Кисурин-Евгеньева О. П., Брянцева С. А., Штиль А. А., Онищенко Г. Е. 2006. Антигубулиновые агенты могут индуцировать различные пути апоптоза. *Биофизика*. 51 (5) : 875—879.
- Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. 2006. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем. *Успехи соврем. естествознания. Мед. науки*. 7 : 37—41.
- Agarwal M. L., Taylor W. R., Chernov M. V., Chernova O. B., George R., Stark G. R. 1998. The p53 network. *J. Biol. Chem.* 273 : 1—4.
- Bilska L., Wtodek L. 2005. Lipoic acid — the drug or the future? *Pharm. Reports*. 57 : 570—577.
- Brash D. E., Havre P. A. 2002. New careers for antioxidants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 13 969—13 971.
- Byun C. H., Koh J. M., Kim D. K., Park S. I., Lee K. U., Kim G. S. 2005. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 20 : 1125—1135.
- Cakatay U. 2006. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med. Hypotheses*. 66 (1) : 110—117.
- Dovinova I., Novotny L., Rauko P., Kvasnicka P. 1999. Combined effect of lipoic acid and doxorubicin in murine leukemia. *Neoplasma*. 46 : 237—241.
- Droge W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82 : 47—95.
- Fenech M. 1994. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Env. Health Perspectives Supplements*. 101 : 101—107.
- Grady W. M. 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23 : 11—27.
- Guan Z., Wang X. R., Zhu X. F., Huang X. F., Xu J., Wang L. H., Wan X. B., Long Z. J., Liu J. N., Feng G. K., Huang W., Zeng Y. X., Chen F. J., Liu Q. 2007. Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. *Cancer Res.* 67 : 10 436—10 444.
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. 2003. Apoptosis — the p53 network. *J. Cell Sci.* 116 : 4077—4085.
- Hultberg M., Hultberg B. 2006. The effect of different antioxidants on glutathione turnover in human cell lines and their interaction with hydrogen peroxide. *Chem. Biol. Interact.* 163 : 192—198.
- Hupp T. R., Sparks A., Lane D. P. 1995. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*. 83 : 237—245.
- Jimenez G. S., Khan S. H., Stommel J. M., Wahl G. M. 1999. p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene*. 18 : 7656—7665.
- Kim A. L., Athar M., Bickers D. R., Gautier J. J. 2002. Ultraviolet-B-induced G1 arrest is mediated by downregulation of cyclin-dependent kinase 4 in transformed keratinocytes lacking functional p53. *Invest. Dermatol.* 118 : 818—824.
- Kurose A., Sasaki K., Ishida Y., Shibata Y., Yanagisawa S., Kanno C., Uesugi N., Wada T., Miura Y. 1995. Flow cytometric analysis of p53 expression during the cell cycle. *Oncology*. 52 : 123—127.
- Kwok T. T., Mok C. H., Menton-Brennan L. 1994. Up-regulation of a mutant form of p53 by doxorubicin in human squamous carcinoma cells. *Cancer Res.* 54 : 2834—2836.
- Lange B. M. 2002. Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (1) : 35—43.
- Levy E. J., Anderson M. E., Meister A. 1993. Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 90 : 9171—9175.
- Marsh S. A., Laursen P. B., Pat B. K., Gobe G. C., Coombes J. S. 2005. Bcl-2 in endothelial cells is increased by vitamin E and alpha-lipoic acid supplementation but not exercise training. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38 : 445—451.
- Moll U. M., Wolff S., Speidel D., Deppert W. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 631—636.
- Moungjaroen J., Nimmannit U., Callery P. S., Wang L., Azad N., Lipipun V., Chanvorachote P., Rojanasakul Y. 2006. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 : 1062—1069.
- Nagai H., Noguchi T., Takeda K., Ichijo H. 2007. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40 : 1—6.
- Nakano H., Nakajima A., Sakon-Komazawa S., Piao J.-H., Xue X., Okumura K. 2006. Reactive oxygen species mediate cross-talk between NF- $\kappa$ B and JNK. *Cell Death Differ.* 13 : 730—737.
- Oda-Sato E., Tanaka N. 2007. Abnormal centrosome amplification and aurora-A activation in p53-deficient cells. *J. Nippon Med. Sch.* 74 : 384—385.
- Pan M. H., Sin Y. H., Lai C. S., Wang Y. J., Lin J. K., Wang M., Ho C. T. 2005. Induction of apoptosis by 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione through reactive oxygen species production, GADD153 expression, and caspases activation in human epidermoid carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 9039—9049.
- Papa S., Bubici C., Zazzeroni F., Pham C. G., Kuntzen C., Knabb J. R., Dean K., Franzoso G. 2006. The NF- $\kappa$ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ.* 13 : 712—729.
- Park D. J., Nakamura H., Chumakov A. M., Said J. W., Miller C. W., Chen D. L., Koeffler H. P. 1994. Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene*. 9 : 1899—1906.
- Pias E. K., Aw T. Y. 2002. Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production. *FASEB J.* 16 : 781—790.
- Prahalathan C., Selvakumar E., Varalakshmi P., Kumarasamy P., Saravanan R. 2006. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. *Toxicology*. 222 : 225—232.
- Qanungo S., Wang M., Nieminen A.-L. 2004. N-acetyl-L-cysteine enhances apoptosis through inhibition of nuclear factor-kappaB in hypoxic murine embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279 : 50 455—50 464.
- Rajagopalan H., Lengauer C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature*. 432 : 338—341.
- Scian M. J., Stagliano K. E., Ellis M. A., Hassan S., Bowman M., Miles M. F., Deb S. P., Deb S. 2004. Modulation of gene expression by tumor-derived p53 mutants. *Cancer Res.* 64 : 7447—7454.
- Seo Y. R., Fishel M. L., Amundson S., Kelley M. R., Smith M. L. 2002. Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence. *Oncogene*. 21 : 731—737.
- Simbula G., Columbano A., Ledda-Columbano G. M., Sanna L., Deidda M., Diana A., Pibiri M. 2007. Increased ROS generation and p53 activation in  $\alpha$ -lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis*. 12 : 113—123.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279 : 1005L—1028L.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160 : 1—40.
- Van de Mark K., Chen J. S., Steliou K., Perrine S. P., Falter D. V. 2003.  $\alpha$ -Lipoic acid induces p27<sup>Kip</sup>-dependent cell cycle

arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J. Cell. Physiol.* 194 : 325—340.

*Van Schooten F. J., Nia A. B., De Flora S., D'Agostini F., Iz-zotti A., Camoirano A., Balm A. J. M., Dallinga J. W., Bast A., Haenen G. R. M. M., Van't Veer L., Baas P., Sakai H., Van Zandwijk N.* 2002. Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 : 167—175.

*Weaver B. A., Cleveland D. W.* 2006. Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 : 658—667.

*Weinmann L., Wischhusen J., Demma M. J., Naumann U., Roth P., Dasmahapatra B., Weller M.* 2008. A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 15 : 718—729.

*Wenzel U., Nickel A., Daniel H.* 2005. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochond-

rial respiration with a concomitant O<sub>2</sub>-generation. *Apoptosis.* 10 : 359—368.

*Wong R. P., Tsang W. P., Chau P. Y., Co N. N., Tsang T. Y., Kwok T. T.* 2007. p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Mol. Cancer Ther.* 6 : 1054—1061.

*You H., Yu W., Sanders B. G., Kline K.* 2001. RRR- $\alpha$ -tocopheryl succinate induces MDA-MB-435 and MCF-7 human breast cancer cells to undergo differentiation. *Cell Growth Differ.* 12 : 471—480.

*Zhang W.-J., Wei H., Hagen T., Frei B.* 2007.  $\alpha$ -Lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 4077—4082.

Поступила 1 VII 2009

#### ALFA-LIPOIC ACID TRIGGERS ELIMINATION OF CELLS WITH ABNORMAL NUCLEI IN HUMAN CARCINOMA EPIDERMOID CELL LINE

*O. P. Kisurina-Evgenieva, G. E. Onishchenko*

Department of Cell Biology and Histology, M. V. Lomonosov Moscow State University;  
e-mail: evgenieva@mail.ru

The skin is usually exposed to adverse environmental conditions that may cause pathological cell proliferation and cellular transformations leading to the formation of malignant cells. Antioxidants may affect these processes and induce the elimination of transformed cell. The purpose of this work was to investigate the effect of alfa-lipoic acid on human carcinoma epidermoid cell line A431. Our results showed that alfa-lipoic acid induced inhibition of cell proliferation or stimulated apoptotic cell death. Cells with abnormal nuclei were eliminated by apoptosis. Electron microscopy showed that survived cells had typical for control cells shape and organization of the nuclei, organization of the cytoplasm and organelles. Thus, alfa-lipoic acid not only triggered apoptosis of carcinoma cells, but it may also activate the mechanism of elimination of cells with abnormal chromosome number.

**Key words:** alfa-lipoic acid, carcinoma epidermoid cell line, apoptosis, p53.