

УДК 577.1: 616-006  
©Коллектив авторов

## КАРНОЗИН УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ И ЦИКЛИНА В1 ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ

*Ю.С. Рыбакова<sup>1\*</sup>, А.Л. Кален<sup>2</sup>, Д.С. Экерс<sup>2</sup>, Т.Н. Федорова<sup>1</sup>,  
П.С. Госвами<sup>2</sup>, И.Х. Сарсур<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Научный центр неврологии,  
125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80; факс: +7(495)490-2210,  
эл. почта: julie\_ribakova@yahoo.com

<sup>2</sup>Free Radical and Radiation Biology Division, Department of Radiation Oncology, University  
of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA; fax: +1 (319) 335-8039; e-mail: ehab-sarsour@uiowa.edu

Карнозин представляет собой эндогенный дипептид, обладающий антипролиферативными свойствами. В данной работе мы показали, что карнозин избирательно ингибирует рост клеток глиобластомы человека (U-118-MG) по сравнению с клетками карциномы горла (FaDu), рта (Cal27) и молочной железы (MB231). Замедление пролиферации клеток U-118-MG сопровождалось значительным снижением внутриклеточного уровня активных форм кислорода, увеличением экспрессии марганцевой супероксиддисмутазы (MnСОД) и циклина В1, что приводило к формированию G<sub>2</sub>-блока. На основе полученных данных, было сделано заключение о том, что антипролиферативные свойства карнозина обусловлены его способностью усиливать экспрессию MnСОД и циклина В1. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов применения карнозина в терапии опухолевых заболеваний головного мозга.

**Ключевые слова:** карнозин, MnСОД, клеточный цикл, G<sub>2</sub>-блок, циклин В1, анзерин.

**DOI:** 10.18097/PBMC20156104510

### ВВЕДЕНИЕ

Карнозин представляет собой природный дипептид, состоящий из двух аминокислот – β-аланина и L-гистидина. В организме человека карнозин представлен во многих тканях, а самые высокие его концентрации определяются в скелетных мышцах (~20 мМ) и в обонятельных луковицах головного мозга (~2,5 мМ) [1, 2]. Карнозин синтезируется ферментом карнозин-синтетазой, которая катализирует реакцию образования пептидной связи между β-аланином и L-гистидином, используя энергию АТФ и ионы Mg<sup>2+</sup> [3]. Разрушение карнозина на составляющие его аминокислоты осуществляется преимущественно сывороточной карнозиной (CN1) [4]. Карнозину свойственны различные функции, в том числе: протонный буфер в скелетных мышцах [5], хелатор двухвалентных переходных металлов (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) [6], антиоксидант [7-11], ингибитор пролиферации опухолевых клеток [12-16].

Антиоксидантные свойства карнозина заключаются в его способности взаимодействовать с продуктом реакции Фентона – гидроксильным радикалом (НО•), предотвращая дальнейшее развитие свободнорадикальных реакций, таких как перекисное окисление липидов [8]. С помощью метода электронного парамагнитного резонанса было показано, что карнозин способен формировать временный комплекс с НО•, образованным в системе Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [9]. В нескольких независимых исследованиях было продемонстрировано эффективное подавление накопления продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида, пероксильных радикалов, ненасыщенных альдегидов, 4-гидроксиноненаля) в присутствии карнозина [7, 8, 10]. Кроме того, карнозин ингибировал окисление голубого тетразолия под действием супероксидного аниона (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), образованного в системе ксантин/ксантиноксидаза, что свидетельствует о способности карнозина взаимодействовать с (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) и подавлять индуцируемое им окисление [17].

\* - адресат для переписки

В 1986 Nagai и Suda впервые обнаружили антипролиферативный эффект карнозина на клетки саркомы, имплантированные мышам линии ddY [12]. Подкожные инъекции карнозина снижали интенсивность пролиферации опухолевых клеток и увеличивали выживаемость животных [12]. Позже в независимом исследовании Renner и соавт. на мышах с ксенографтами HER2/neu NIH3T3 фибробластов было показано, что ежедневные внутрибрюшинные инъекции карнозина существенно подавляют пролиферацию злокачественных клеток и опухолевый рост [14]. Holliday и McFarland продемонстрировали избирательность действия карнозина по отношению к опухолевым клеткам. Добавление карнозина к смеси клеток карциномы шейки матки (HeLa) и нормальных человеческих фибробластов (MRC-5) приводило к выборочному уничтожению опухолевых клеток [13].

В данном исследовании, мы предположили, что антипролиферативный эффект карнозина обусловлен его способностью увеличивать антиоксидантную ёмкость клетки и замедлять прогрессию клеточного цикла. Мы показали, что инкубация с карнозином значительно замедляет пролиферацию клеток глиобластомы, что сопровождается увеличением экспрессии марганцевой супероксиддисмутазы (MnСОD) и индукцией G<sub>2</sub>-блока.

## МЕТОДИКА

### *Культуры клеток*

В работе были использованы следующие клеточные линии: карциномы горла (FaDu), рта (Cal27) и молочной железы (MB231) человека, глиобластома человека (U-118-MG). Клетки FaDu и Cal27 культивировали в среде DMEM ("Gibco", США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, "HyClone", США) и 100 ед/мл ПенСтреп ("Gibco"). Клетки MB231 инкубировали в среде RPMI 1640 ("Gibco") с добавлением 10% FBS и 100 ед/мл ПенСтреп ("Gibco"). Клетки U-118-MG культивировали в смеси DMEM:F12 (1:1) с добавлением 15 mM HEPES ("Gibco"), 1 mM пирувата натрия ("Gibco"), 10 мкг/мл инсулина ("Sigma Aldrich", США), 5 нг/мл фактора роста фибробластов ("Sigma Aldrich"), 15% FBS ("HyClone") и 100 ед/мл ПенСтреп ("Gibco"). Клетки содержали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ("NUAIRE", США) в присутствии 5% CO<sub>2</sub>, 98% влажности и 37°C. Карнозин (чистота 99%) и гомакарнозин (чистота 99%) были получены в "Nagai Chemicals, LTD" (Япония). Анзерин (чистота 99%) был приобретён в "Yaizu Suisankagaku Industry Co., Ltd." (Япония). N-ацетилкарнозин (чистота 98,7%) и D-карнозин (чистота 97,5%) были синтезированы при помощи стандартных методов в Лаборатории клинической и экспериментальной нейробиологии ИЦН РАН.

### *Исследование клеточной пролиферации*

Клетки высевали в чашки Петри диаметром 60 мм. Каждые два дня клетки снимали с помощью

трипсина и считали их количество с помощью Z1 Coulter Counter ("Beckman Coulter", США). Время удвоения популяции (Т<sub>д</sub>) рассчитывали на экспоненциальном участке кривой роста по формуле:  $T_d = 0,693t / \ln(N_t/N_0)$ , где  $t$  – время (дни),  $N_0$  – начальное количество клеток,  $N_t$  – количество клеток ко дню  $t$ . Выживаемость клеток определяли по их способности формировать колонии. Клетки высевали в низких разведениях в 60 мм чашки Петри, по истечении 14 дней клетки фиксировали в 70% этаноле, окрашивали с помощью 0,05% синего кумасси (G-250). Далее подсчитывали количество колоний состоящих из 50 и более клеток и вычисляли эффективность посева (ЭП) по формуле:  $ЭП = (\text{количество колоний} / \text{количество посаженных клеток}) \times 100$ . Выживаемость рассчитывали как процентное соотношение ЭП в клетках, обработанных карнозином, к ЭП клеток в контроле.

### *Измерение уровня АФК*

Клетки 15 мин инкубировали в буфере Хэнкса ("Gibco"), содержащем 1 мкг/мл DCFH<sub>2</sub>-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетат) ("Invitrogen", США). Затем клетки снимали с подложек с помощью трипсина и отмывали в буфере Хэнкса. Пробы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur ("BD", США), оснащённом ионным аргонным лазером с длиной волны 488 нм. Зелёную флуоресценцию DCF детектировали с помощью светофильтра 585/82 нм. Данные обрабатывали в программе FlowJo v8.8.7 ("BD"). Среднее значение интенсивности флуоресценции корректировали относительно автофлуоресценции неокрашенных клеток. Результаты представлены в виде среднего значения флуоресценции, рассчитанного относительно контроля.

### *Двухпараметрический анализ клеточного цикла*

Двухпараметрический анализ клеточного цикла проводили согласно ранее опубликованному протоколу [18]. Клетки инкубировали 30 мин с 10 мкл 5-бромдезоксидеоксиуридина (БДУ) и затем фиксировали в 70% этаноле. Фиксированные клетки инкубировали 30 мин в пепсине (0,4 мг/мл в 2 М HCl) и нейтрализовали в 0,1 М боратном буфере. Пробы центрифугировали в течение 5 мин на микроцентрифуге Eppendorf 5415 при 4°C (15000 об/мин), осадок инкубировали 1 ч с мышиными антителами против БДУ (1:10, "BD") и 1 ч с антимышиными козьими ФИТЦ-конъюгированными антителами (1:10, "BD"). После клетки инкубировали 30 мин с 1 мг/мл РНКазы ("Invitrogen") и 60 мин с 35 мкг/мл йодида пропидия ("Invitrogen"). Пробы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur ("BD"), оснащённом ионным аргонным лазером с длиной волны 488 нм. Красную флуоресценцию (йодид пропидия) детектировали с помощью светофильтра 585/82 нм, для зелёной флуоресценции (ФИТЦ) использовали светофильтр 530/30 нм. В каждой пробе анализировали минимум 20000 событий и рассчитывали распределение

клеток по фазам клеточного цикла с помощью программы FlowJo v8.8.7.

### Иммуноблоттинг

Для выделения белков клетки разрушали с помощью ультразвука в лизирующем буфере, содержащем фосфатный буфер (pH 7,8), ингибитор фосфатаз (PhosSTOP, “Roche”, США), коктейль ингибиторов протеаз (“Sigma”), 2% NP-40 и ДНКазу (0,01 ед/мкл, “Zymo Research Corp.”, США). Равные количества белка разделяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и переносили с помощью полусухого электротранспорта на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны инкубировали с антителами против MnСОД (1:1000, “Millipore”, США), циклина В1 (1:1000, “BD”) и актина (1:1000, “Millipore”). В качестве вторичных антител были использованы меченные пероксидазой хрена овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши (1:5000, “GE Healthcare”) и ослиные антитела против иммуноглобулинов кролика (1:10,000, “GE Healthcare”). Иммунореактивные полосы визуализировали с помощью набора Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (“Thermo Scientific”, США), согласно инструкции производителя и детектировали с помощью Typhoon FLA 7000 (“General Electric”, США). Интенсивность полос анализировали в программе ImageJ (“NIH”, США). Нормирование количества белка проводили относительно уровня актина.

### Определение активности MnСОД

Равные количества нативного белка разделяли с помощью неденатурирующего электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле. Активность MnСОД определяли по методу предложенному ранее [19]. Гель инкубировали в окрашивающей смеси, содержащей нитросиний тетразолий и рибофлавин. Окрашенный гель проявляли на свету до появления прозрачных полос. Проявленный гель сканировали с помощью Epson Perfection 4990 PHOTO и анализировали интенсивность полос в программе ImageJ (“NIH”).

### Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

РНК выделяли с использованием набора Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit, согласно

Таблица. ПЦР праймеры использованные в исследовании.

Ген	№ банка генов	Последовательность (5' → 3')	Размер ампликона (млн. пар)
CCNB1	NM_031966.3	Прямая: TAGCACTGAAAATTCTGGATAATGGTGA Обратная: TTGATTTACCATGACTACATTCTTAGCCAG	125
ACTB	NM_001101.3	Прямая: TCACCATTTGGCAATGAGCGGTT Обратная: AGTTTCGTGGATGCCACAGGACT	89
CRNS1	NM_001166222.1 NM_020811.1	Прямая: AAGCTGGAGGAGGAGGAGAGTGTCTC Обратная: CCTTGCTCAGCAGTGGCCTATCA	154
MnSOD	NM_000636.2	Прямая: TTGGCCAAGGGAGATGTTAC Обратная: AGTCACGTTTGATGGCTTCC	157

инструкции производителя (“Zymo Research Corp.”). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали с помощью набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (“Applied Biosystems”). Уровень РНК измеряли методом ПЦР в реальном времени (“Applied Biosystems”), используя последовательности праймеров для индивидуальных генов, представленных в таблице. Данные анализировали в программе StepOne Software v2.2 (“Applied Biosystems”) и рассчитывали значения относительной экспрессии ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) в Microsoft Excel (“Microsoft”, США).

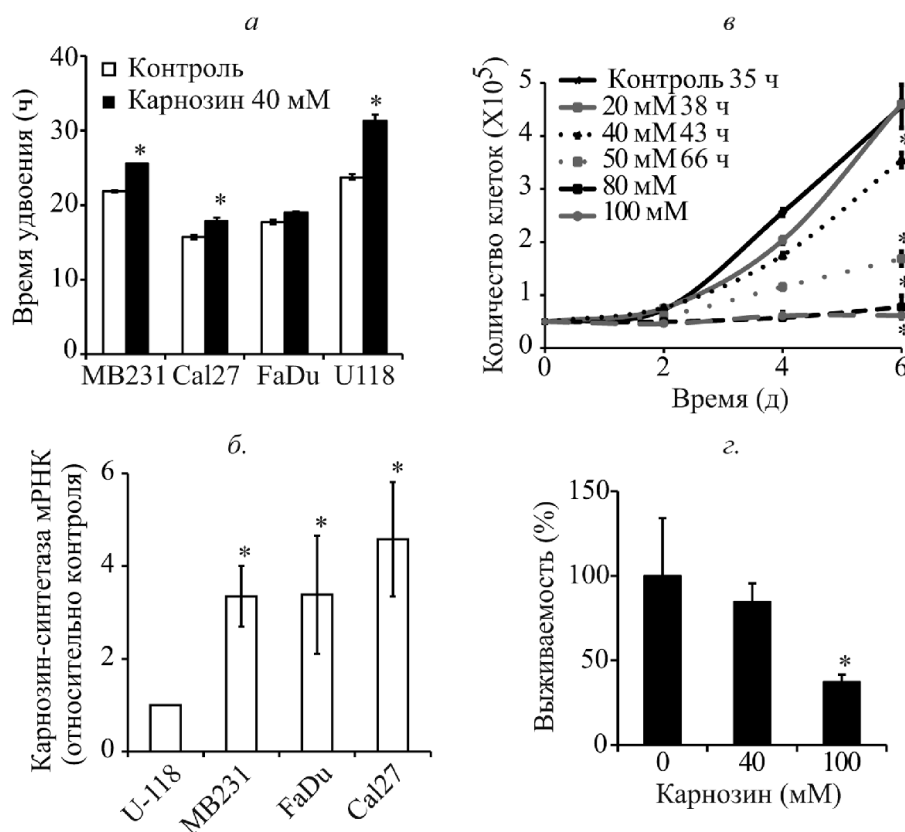
### Статистическая обработка результатов

Статистическую значимость определяли с помощью одномерного дисперсионного анализа с последующим тестом на наименьшую значимую разность и тестом на взвешенное среднее Тьюки. Данные тесты используются для сравнения и определения разницы между и в пределах групп данных в зависимости от значений среднего и среднеквадратических ошибок для каждой переменной. Гомогенность дисперсии брали в пределах доверительного интервала в 95%. Результаты со значениями  $p < 0,05$  принимались как статистически значимые.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Карнозин избирательно ингибирует пролиферацию клеток глиобластомы человека U-118-MG

Для того чтобы определить, ингибирует ли карнозин пролиферацию клеток карциномы горла (FaDu), рта (Cal27), молочной железы (MB231) и глиобластомы человека (U-118-MG), к среде культивирования добавляли карнозин (40 мМ) и оставляли на инкубацию. Каждые два дня в течение 6 дней клетки подсчитывали и вычисляли время удвоения популяции. Как следует из результатов эксперимента, представленных на рисунке 1А, карнозин ингибировал пролиферацию всех четырех клеточных линий. Время удвоения популяции в контроле составляло: 18 ч (FaDu), 16 ч (Cal27), 22 ч (MB231) и 24 ч (U-118-MG). Инкубация с карнозином увеличивала время удвоения популяции до: 19 ч (FaDu), 18 ч (Cal27), 26 ч (MB231) и 32 ч (U-118-MG). Из полученных данных видно, что хотя карнозин ингибировал пролиферацию всех исследованных линий опухолевых клеток,



**Рисунок 1.** Карнозин ингибирует пролиферацию клеток глиобластомы человека эффективнее, чем клеток карцином рта и горла и молочной железы. *а* - К среде культивирования добавляли карнозин (40 мМ) и оставляли инкубироваться. Количество клеток считали каждые два дня в течение 6 дней. Время удвоения популяций рассчитывали на экспоненциальном участке кривой роста. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от контроля;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . *б* - Эндогенный уровень мРНК карнозин-синтетазы измеряли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от уровня мРНК в клетках U-118-MG;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . *в* - Клетки U-118-MG культивировали в среде с добавлением карнозина в разных концентрациях. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от количества клеток в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . *г* - Выживаемость клеток оценивали по способности формировать колонии. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от выживаемости в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ .

наиболее выраженный антипролиферативный эффект карнозина проявлялся на клетках глиобластомы. Различия в эффективности действия карнозина на пролиферацию опухолевых клеток могут быть связаны с различиями в базальном уровне экспрессии карнозинсинтетазы. Уровень мРНК карнозинсинтетазы в клетках FaDu, Cal27 и MB231 был в 3,5-5 раз выше, чем в клетках U-118-MG (рис. 1Б). На основании этих данных можно предположить, что из-за адаптации к более высокому уровню биосинтеза карнозина клетки FaDu, Cal27 и MB231 менее восприимчивы к ингибирующему рост действию карнозина. Примечательно, что клетки U-118-MG с низким уровнем карнозинсинтетазы более чувствительны к антипролиферативному эффекту карнозина.

Поскольку наиболее выраженный антипролиферативный эффект карнозина был получен на клетках глиобластомы человека U-118-MG, эти клетки были использованы в дальнейших

исследованиях. Для более подробного изучения антипролиферативного действия карнозина, клетки U-118-MG инкубировали в среде, в которую добавляли 20-100 мМ карнозин и измеряли время удвоения популяции. Инкубация с карнозином приводит к дозо-зависимому удлинению времени удвоения пролиферации с 35 ч в контроле до 66 ч после инкубации с 50 мМ карнозином (рис. 1В). Пролiferация клеток была полностью подавлена под действием 80-100 мМ карнозина (рис. 1В). Ингибирующий эффект карнозина на пролиферацию клеток U-118-MG был подтверждён результатами измерения способностей клеток формировать колонии (рис. 1Г). Клетки, обработанные 100 мМ карнозином, демонстрировали снижение выживаемости (примерно на 60%), что ещё раз указывало на способность карнозина ингибировать пролиферацию клеток глиобластомы человека U-118-MG.

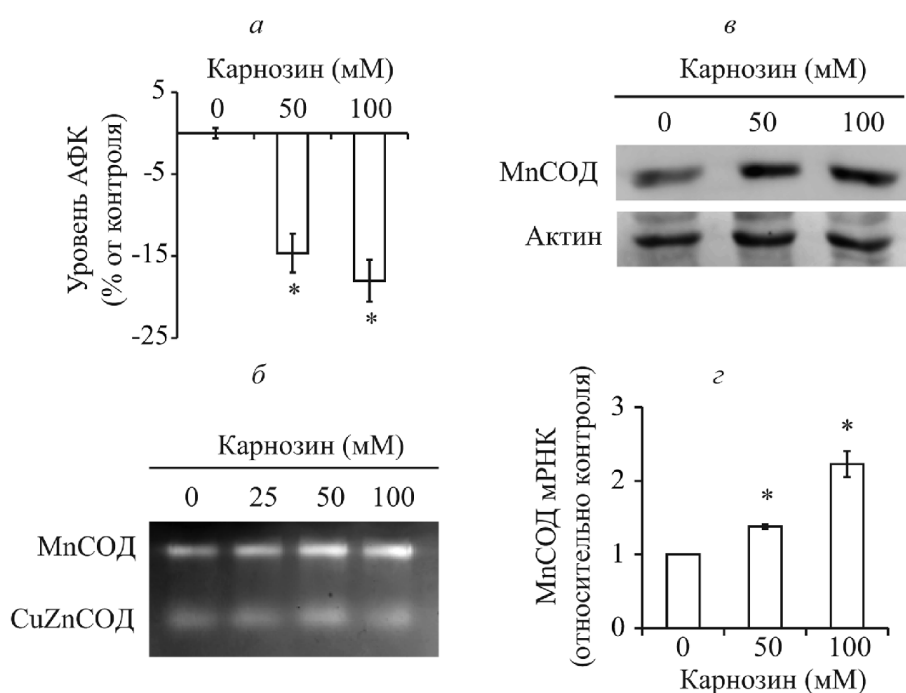


*Карнозин снижает внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) и увеличивает экспрессию марганцевой супероксиддисмутазы (MnСОД)*

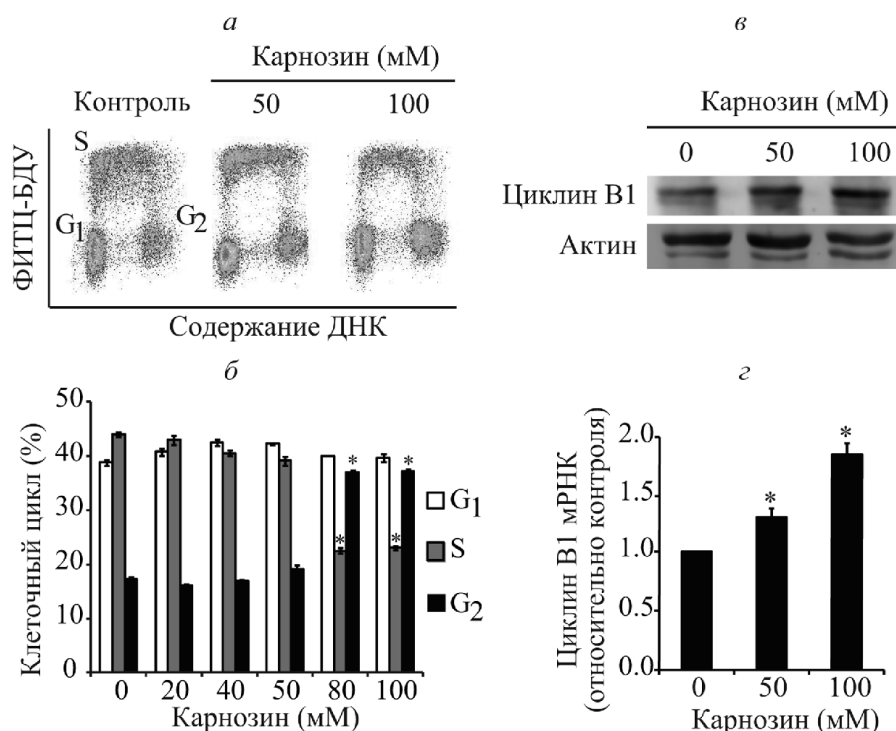
В наших предыдущих работах показано, что уровень АФК и активность MnСОД регулируют пролиферацию клеток [18, 19]. Для того чтобы определить, связан ли антипролиферативный эффект карнозина с изменениями внутриклеточного уровня АФК, с помощью метода проточной цитометрии [19] был измерен уровень АФК в контроле и в клетках, обработанных карнозином. Уровень АФК в клетках, обработанных 50-100 мМ карнозином, был на 15-18% ниже по сравнению с уровнем АФК в контроле (рис. 2А). Снижение внутриклеточного уровня АФК коррелировало с существенным усилением экспрессии MnСОД. Активность MnСОД в клетках обработанных карнозином была в 3-4 раза выше, чем в контроле (рис. 2Б). Увеличение активности MnСОД сопровождалось соответствующим приростом уровня белка и мРНК MnСОД (рис. 2В,Г). Измерение активности цитозольной формы СОД (CuZnСОД) не выявило каких либо изменений. Поскольку MnСОД представляет собой антиоксидантный фермент, расположенный в матриксе митохондрий, исходя из полученных данных можно предположить, что антипролиферативный эффект карнозина является результатом изменения уровня АФК, генерируемых в митохондриях.

*Карнозин индуцирует G<sub>2</sub>-блок и увеличение экспрессии циклина В1*

Для того чтобы определить, являются антипролиферативные свойства карнозина результатом изменений в прогрессии клеточного цикла, с помощью двухпараметрического анализа клеточного цикла на проточном цитометре [18] было измерено процентное распределение клеток U-118-MG между G<sub>1</sub>-, S- и G<sub>2</sub>-фазами клеточного цикла в контроле и после инкубации с карнозином. Пример гистограмм распределения окрашенных БДУ (S фаза) и неокрашенных (G<sub>1</sub>- и G<sub>2</sub>-фазы) популяций клеток в контроле и после инкубации с карнозином представлен на рисунке 3А. Инкубация с карнозином приводила к дозо-зависимому увеличению количества клеток в G<sub>2</sub>-фазе, что сопровождалось соответствующим уменьшением количества клеток в S-фазе (рис. 3Б). Распределение клеток в контроле было: 39% G<sub>1</sub>-фаза, 44% S-фаза, и 1% G<sub>2</sub>-фаза. Инкубация клеток с карнозином в концентрации 20-50 мМ не приводила к значительным изменениям в распределении клеток по фазам клеточного цикла. Однако, в пробах, обработанных 80-100 мМ карнозином, существенно возрастало количество клеток в G<sub>2</sub>-фазе (до 37% по сравнению с 17% в контроле), что сопровождалось соответствующим снижением процента клеток в S-фазе (до 22% по сравнению с 42% в контроле). Полученные результаты



**Рисунок 2.** Карнозин снижает внутриклеточный уровень АФК и усиливает экспрессию MnСОД в клетках глиобластомы U-118-MG. Клетки обрабатывали 25-100 мМ карнозина в течение 24 ч. *а* - Внутриклеточный уровень АФК измеряли на проточном цитометре по степени окисления DCFH. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от уровня АФК в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . *б* - Активность MnСОД измеренная с помощью метода электрофореза в неденатурирующем геле. *в* - Иммуноблот, демонстрирующий уровень белка MnСОД, актин использовали для нормирования количества белка. *г* - Уровень мРНК MnСОД измеряли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от уровня мРНК MnСОД в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ .



**Рисунок 3.** Карнозин индуцирует G<sub>2</sub>-блок и усиливает экспрессию циклина В1 в клетках глиобластомы U-118-MG. Клетки метили БДУ и измеряли процент БДУ-позитивных (S-фазы) и -негативных (G<sub>1</sub>- и G<sub>2</sub>-фазы) клеток с помощью метода двух-параметрического анализа на проточном цитометре. *а* - Пример диаграмм распределения клеток U-118-MG по фазам клеточного цикла. *б* - Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла в контроле и после инкубации с карнозином. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от количества клеток в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . *в* - Иммуноблот демонстрирующий уровень циклина В1 и актина. *г* - Уровень мРНК циклина В1 измеряли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от уровня мРНК циклина В1 в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ .

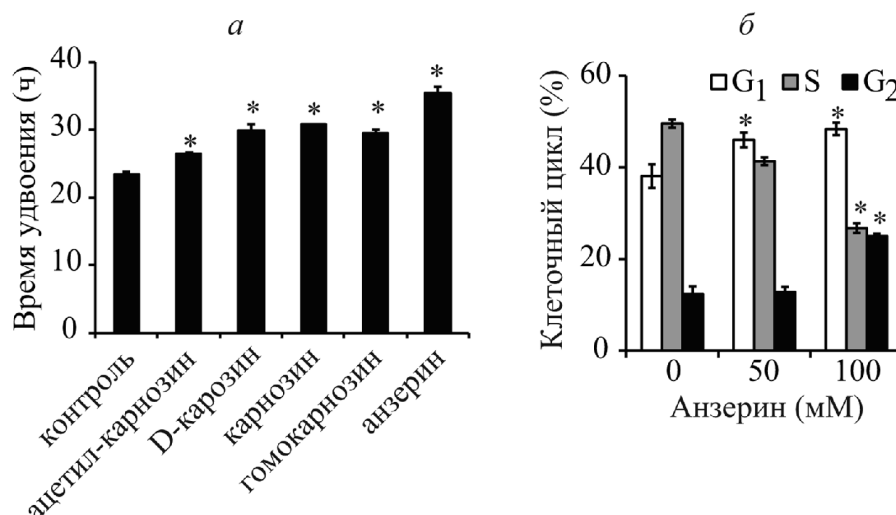
свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект карнозина может быть обусловлен его способностью нарушать прогрессию клеточного цикла через G<sub>2</sub>-фазу.

Прогрессия клеточного цикла от одной фазы к другой сопровождается периодической экспрессией специфических циклинов [20]. Циклин В1 специфически экспрессируется в течение G<sub>2</sub>-фазы, и его накопление часто служит маркером для измерения прогрессии через G<sub>2</sub>-фазу. Для того чтобы определить, связано ли индуцированное карнозином накопление клеток в G<sub>2</sub>-фазе с изменениями экспрессии циклина В1, клетки U-118-MG обрабатывали 50 мМ и 100 мМ карнозином в течение 24 ч и измеряли уровень белка и мРНК циклина В1. В клетках, обработанных 50 мМ и 100 мМ карнозином, уровень белка циклина В1 достоверно увеличивался в 2,5 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контролем (рис. 3В). Индуцированное карнозином увеличение уровня циклина В1 в клетках U-118-MG сопровождалось соответствующим увеличением уровня мРНК циклина В1 (рис. 3Г). На основе полученных результатов можно предположить, что антипролиферативный эффект карнозина является следствием его способности усиливать экспрессию циклина В1 и индуцировать G<sub>2</sub>-блок.

*Анзерин ингибирует пролиферацию клеток U-118-MG эффективнее, чем карнозин*

Антипролиферативный эффект карнозина сравнили с действием его производных: ацетилкарнозина (N-ацетил-β-аланил-L-гистидин), анзерина (β-аланил-3-метил-L-гистидин), гомокарнозина (γ-амино-бутирил-L-гистидин) и D-карнозина (β-аланил-D-гистидин). Клетки U-118-MG инкубировали с 40 мМ карнозином или его производными. Каждые два дня в течение 6 дней клетки считали и рассчитывали время удвоения популяции. Как видно из рисунка 4А, все исследованные вещества в концентрации 40 мМ приводили к удлинению времени удвоения популяции клеток глиобластомы по сравнению с контролем (рис. 4А). Наиболее выраженное антипролиферативное действие оказывал анзерин, приводя к удлинению времени удвоения популяции до 35 ч по сравнению с 23 ч в контроле (рис. 4А).

Для того чтобы определить, является ли увеличение времени удвоения популяции под действием анзерина следствием изменений в прогрессии клеточного цикла, клетки обрабатывали 50 и 100 мМ анзерина в течение 24 ч и метили БДУ. Процентное распределение клеток между G<sub>1</sub>-, S- и G<sub>2</sub>-фазами клеточного цикла было измерено



**Рисунок 4.** Анзерин ингибирует пролиферацию клеток глиобластомы U-118-MG эффективнее, чем другие производные карнозина. *а* - К среде культивирования добавляли дипептиды в концентрации 40 мМ и оставляли инкубироваться. Количество клеток считали каждые два дня в течение 6 дней. Время удвоения популяций рассчитывали, как показано на рисунке 1А. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от Тд в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ . В отдельной серии экспериментов, клетки в контроле и после инкубации с анзеринном метили БДУ и анализировали распределение по фазам клеточного цикла на проточном цитометре. *б* - Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла. Звёздочка обозначает статистически значимое отличие от количества клеток в контроле;  $n=3$ ,  $p<0,05$ .

с помощью двухпараметрического анализа клеточного цикла на проточном цитометре. Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла показано на рисунке 4Б. Распределение в контроле было: 38% G<sub>1</sub>-фаза, 50% S-фаза, и 12% G<sub>2</sub>-фаза. Инкубация клеток с 100 мМ анзеринном приводила к следующим изменениям в прогрессии клеточного цикла: 48% G<sub>1</sub>-фаза, 27% S-фаза, и 25% G<sub>2</sub>-фаза (рис. 4Б, нижняя панель). Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что хотя как карнозин, так и анзерин увеличивают время удвоения популяции и индуцируют G<sub>2</sub>-блок, анзерин эффективнее ингибирует пролиферацию клеток U-118-MG, чем карнозин.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Карнозин представляет собой эндогенный дипептид, широко распространенный в организме человека в мышцах и мозге [1, 2]. Несмотря на то, что антипролиферативные свойства карнозина уже были описаны ранее [12-14], механизмы ингибирующего эффекта карнозина на рост опухолевых клеток остаются неясными. В настоящем исследовании мы показали, что ингибирование пролиферации опухолевых клеток под действием карнозина сопровождается снижением внутриклеточного уровня АФК, увеличением экспрессии MnСОД и циклина В1, и накоплением клеток в G<sub>2</sub>-фазе клеточного цикла. Полученные результаты позволяют предположить, что антипролиферативные свойства карнозина обусловлены его способностью усилить

внутриклеточную антиоксидантную ёмкость и нарушать прогрессию клеточного цикла.

Инкубация с карнозином приводила к удлинению времени удвоения популяции всех четырёх исследованных линий опухолевых клеток, однако, не в равной степени (рис. 1А). Прирост времени удвоения популяции был небольшим для клеток карцином горла, рта и молочной железы, а клетки глиобластомы демонстрировали существенное удлинение времени удвоения популяции. Наши наблюдения согласуются с результатами предыдущих работ, демонстрирующими антипролиферативное действие карнозина на клетки глиобластомы, изолированные из мозга больных мультиформной глиобластомой [21]. Несмотря на то, что для понимания причин различий в эффективности действия карнозина на разные клеточные линии необходимы дополнительные исследования, мы выявили, что процессы, контролируемые эндогенный уровень карнозина, различаются в исследованных клеточных культурах. Карнозин синтезируется с помощью внутриклеточного фермента карнозинсинтетазы. Анализ уровня мРНК карнозинсинтетазы с помощью метода ПЦР в реальном времени выявил достоверные различия в экспрессии карнозинсинтетазы между исследованными клеточными линиями. Наименьший уровень мРНК фермента был обнаружен в клетках глиобластомы (рис. 1Б). Мы предполагаем, что ввиду более высокого уровня экспрессии карнозинсинтетазы (вероятно, приводящего к содержанию большего количества эндогенного карнозина) клетки карцином резистентны к действию экзогенного

карнозина. В то же время клетки глиобластомы с пониженной экспрессией карнозинсинтазы (вероятно, содержащие низкий уровень эндогенного карнозина) оказываются более чувствительными к антипролиферативному эффекту карнозина.

Ингибирующее действие карнозина на рост клеток глиобластомы сопровождалось снижением внутриклеточного уровня АФК (рис. 2А). Это наблюдение согласуется с опубликованными ранее данными, демонстрирующими корреляцию между снижением внутриклеточного уровня АФК и замедлением пролиферации клеток карциномы толстой кишки человека НСТ116 под действием карнозина [16]. Ранее мы показали, что внутриклеточный уровень АФК увеличивается по мере прогрессии клеток через клеточный цикл. Исходя из этого, мы предположили, что пролиферирующие клетки находятся в более окисленном состоянии по сравнению с клетками, делящимися медленно [22, 23]. Снижение уровня АФК под действием карнозина (рис. 2А), вероятно, способствует замедлению пролиферации клеток глиобластомы. Участие внутриклеточных АФК в регуляции клеточного цикла подтверждается данными о том, что карнозин индуцирует экспрессию MnСОД (рис. 2Б-Г). MnСОД представляет собой антиоксидантный фермент, локализованный в митохондриях и катализирующий реакцию дисмутации супероксида в пероксид водорода. Ранее мы показали, что прогрессия клеточного цикла зависит от активности MnСОД: повышение активности MnСОД оказывало ингибирующее действие на клеточный рост, в то время как понижение активности MnСОД усиливало пролиферацию [23, 24]. Активность MnСОД была существенно ниже в S- и G<sub>2</sub>-фазах, что совпадало с увеличением внутриклеточного уровня АФК и усилением пролиферации [23]. Значительное снижение активности MnСОД в опухолевых клетках было продемонстрировано в нескольких исследованиях. Усиление экспрессии MnСОД ингибировало пролиферацию многих линий опухолевых клеток, в том числе клеток глиобластомы человека U-118 [25, 26]. В нашей работе увеличение активности MnСОД при инкубации клеток глиобластомы с карнозином сопровождалось значительным удлинением времени удвоения популяции. Следовательно, можно предположить, что антипролиферативный эффект карнозина обусловлен его способностью усиливать экспрессию MnСОД и приводить к снижению уровня АФК.

Влияние внутриклеточного уровня АФК и активности MnСОД на интенсивность пролиферации было также очевидно ввиду накопления клеток глиобластомы в G<sub>2</sub>-фазе под действием карнозина (рис. 3). В нашей предыдущей работе было показано, что инкубация клеток феохромоцитомы крысы PC-12 с карнозином также приводит к формированию G<sub>2</sub>-блока в прогрессии клеточного [15]. Кроме того, мы продемонстрировали, что усиление экспрессии MnСОД в клетках карциномы рта и поджелудочной

железы усиливает формирование G<sub>2</sub>-блока под действием ионизирующего излучения [27, 28], что подтверждает, ингибирующее действие высокой активности MnСОД на прогрессию клеточного цикла через G<sub>2</sub>-фазу. Поскольку во время прогрессии через G<sub>2</sub>-фазу и митоз (М) внутриклеточный редокс-статус часто смещается в более окисленное состояние [22], мы предполагаем, что препятствуя окислению (например, за счёт снижения уровня АФК) карнозин способствует формированию G<sub>2</sub>-блока. Накопление клеток глиобластомы в G<sub>2</sub>-фазе под действием карнозина сопровождалось соответствующим усилением экспрессии циклина В1 (рис. 3). Циклин В1 является положительным регулятором комплекса циклин В1/CDK1, продвигающего клетки через G<sub>2</sub>- и М-фазы. Экспрессия циклина В1 усиливается в поздней S-фазе, достигает максимума в G<sub>2</sub>, и резко снижается в середине митоза. В G<sub>1</sub>-фазе циклин В1 не детектируется [20]. Таким образом, увеличение уровня циклина В1 в пробах, обработанных карнозином, может быть следствием повышенного содержания клеток в G<sub>2</sub>-фазе. С другой стороны, карнозин может напрямую активировать экспрессию циклина В1 независимо от индукции G<sub>2</sub>-блока. Для изучения механизма активации экспрессии циклина В1 в ответ на действие карнозина необходимы дополнительные исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Мы предполагаем, что антипролиферативный эффект карнозина на клетки глиобластомы человека является следствием его способности усиливать экспрессию MnСОД, приводя к снижению внутриклеточного уровня АФК, а также усиливать экспрессию циклина В1, индуцируя G<sub>2</sub>-блок в прогрессии клеточного цикла. Полученные в работе результаты могут быть использованы для разработки методов применения карнозина в терапии опухолей головного мозга.

*Авторы благодарят Зиту Сайбинэйр и Уушэнга Ксао за техническую поддержку, а также сотрудников отделов Проточной цитометрии Университета Айовы (Free Radical Research Core Facilities at the University of Iowa), а также компанию "Hamari Chemicals, LTD", Осака, Япония за любезно предоставленный карнозин. Работа поддержана грантом фонда Фулбрайт для иностранных студентов (Fulbright Foreign Student Program) (ЮСР), NIH T32 CA078586 (ДСЭ) и NIH 2R01 CA111365 (ПСГ).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Margolis F.L. (1974) Science. **184**, 909-911.
2. Mannion A.F., Jakeman P.M., Dunnett M., Harris R.C., Willan P.L. (1992) Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol., **64**, 47-50.
3. Drozak J., Veiga-da-Cunha M., Vertommen D., Stroobant V., Van Schaftingen E. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 9346-9356.



4. Teufel M., Saudek V., Ledig J.P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., Cairns N.J., Carter C., Cowley D.J., Duverger D., Ganzhorn A.J., Guenet C., Heintzelmann B., Laucher V., Sauvage C., Smirnova T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 6521-6531.
5. Severin S.E. (1955) III Int. Biochem. Congress, Brussels.
6. Brown C.E., Antholine W.E. (1979) *J. Phys. Chem.*, **83**, 3314-3319.
7. Dupin A.M., Boldyrev A.A., Arkhipenko Iu.V., Kagan V.E. (1984) *Bull. Exp. Biol. Med.*, **98**, 186-188.
8. Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K.C., Ames B.N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175-3179.
9. Chan W.K.M., Decker E.A., Lee J.B., Butterfield D.A. (1994) *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1407-1410.
10. Zhou S., Decker E.A. (1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 51-55.
11. Boldyrev A.A., Dupin A.M., Bunin A., Babizhaev M.A., Severin S.E. (1987) *Biochem Int.*, **15**, 1105-1113.
12. Nagai K., Suda T. (1986) *Nihon Seirigaku Zasshi*, **48**, 741-747.
13. Holliday R., McFarland G.A. (1996) *Br. J. Cancer.*, **73**, 966-971.
14. Renner C., Zemitzsch N., Fuchs B., Geiger K.D., Hermes M., Hengstler J., Gebhardt R., Meixensberger J., Gaunitz F. (2010) *Mol. Cancer.*, **9**, 2.
15. Rybakova Y.S., Boldyrev A.A. (2012) *Bull. Exp. Biol. Med.*, **154**, 136-140.
16. Iovine B., Iannella M.L., Nocella F., Pricolo M.R., Bevilacqua M.A. (2012) *Cancer Lett.*, **315**, 122-128.
17. Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Popov I.N., Levin G., Tyulina O.V., Boldyrev A.A., Vladimirov Yu.A. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 99-106.
18. Sarsour E.H., Agarwal M., Pandita T.K., Oberley L.W., Goswami P.C. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18033-18041.
19. Sarsour E.H., Venkataraman S., Kalen A.L., Oberley L.W., Goswami P.C. (2008) *Aging Cell*, **7**, 405-417.
20. Grana X., Reddy E.P. (1995) *Oncogene*, **11**, 211-219.
21. Renner C., Seyffarth A., Garcia de Arriba S., Meixensberger J., Gebhardt R., Gaunitz F. (2008) *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **14**, 127-135.
22. Goswami P.C., Sheren J., Albee L.D., Parsian A., Sim J.E., Ridnour L.A., Higashikubo R., Gius D., Hunt C.R., Spitz D.R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 38384-38392.
23. Sarsour E.H., Kalen A.L., Xiao Z., Veenstra T.D., Chaudhuri L., Venkataraman S., Reigan P., Buettner G.R., Goswami P.C. (2012) *Cancer Res.*, **72**, 3807-3816.
24. Chaudhuri L., Nicholson A.M., Kalen A.L., Goswami P.C. (2012) *Oncogene*, **31**, 1207-1216.
25. Zhong W., Oberley L.W., Oberley T.D., St Clair D.K. (1997) *Oncogene*, **14**, 481-490.
26. Oberley L.W. (2005) *Biomed. Pharmacother.*, **59**, 143-148.
27. Kalen A.L., Sarsour E.H., Venkataraman S., Goswami P.C. (2006) *Antioxid. Redox Signal*, **8**, 1273-1281.
28. Fisher C.J., Goswami P.C. (2008) *Cancer Biol. Ther.*, **7**, 1271-1279.

Поступила: 05. 11. 2013.

## INCREASED MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE AND CYCLIN B1 EXPRESSION IN CARNOSINE-INDUCED INHIBITION OF GLIOBLASTOMA CELL PROLIFERATION

Yu.S. Rybakova<sup>1</sup>, A.L. Kalen<sup>2</sup>, J.C. Eckers<sup>2</sup>, T.N. Fedorova<sup>1</sup>, P.C. Goswami<sup>2</sup>, E.H. Sarsour<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Neurology Research Center,

80 Volokolamskoe shosse, Moscow, 125367 Russia; fax: +7(495)490-2210; e-mail: julie\_ribakova@yahoo.com

<sup>2</sup>Free Radical and Radiation Biology Division, Department of Radiation Oncology, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA; fax: +1 (319) 335-8039; e-mail: ehab-sarsour@uiowa.edu

Carnosine is an endogenous dipeptide with antiproliferative properties. Here we show that carnosine selectively inhibits proliferation of human glioblastoma cells (U-118-MG) compared to breast (MB231) and oral (Cal27 and FaDu) cancer cells. Carnosine-induced inhibition of U-118-MG proliferation is associated with a significant: decrease in cellular reactive oxygen species levels, increase in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and increase in cyclin B1 expression resulting in G<sub>2</sub>-block. We conclude that the antiproliferative property of carnosine is due to its ability to enhance MnSOD and cyclin B1 expression. These results will be of significance to the potential application of carnosine in brain cancer therapy.

**Key words:** carnosine, MnSOD, cell cycle, G<sub>2</sub>-block, cyclin B1, anserine.