

РОЛЬ JNK И УЧАСТИЕ p53 В СТИМУЛЯЦИИ РЕАЛИЗАЦИИ РОСТОВОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ АЛКАЛОИДОМ ЗОНГОРИНОМ

Г.Н.Зюзьков^{*,**}, В.В.Жданов^{*}, Е.В.Удуд^{*}, Л.А.Мирошниченко^{*}, А.В.Чайковский^{*}, Е.В.Симанина^{*}, В.В.Удуд^{*,**}, Л.А.Ставрова^{*}, Т.Ю.Полякова^{*}, М.Ю.Минакова^{*}, О.Ю.Трифопова^{*}, Т.Д.Гриднева^{*}, А.М.Дыгай^{*}

^{*}ФГБНУ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга, Томск, РФ;

^{**}Лаборатория моделирования физических процессов в биологии и медицине ФГБОУ ВПО Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, РФ

В условиях *in vitro* изучены роль JNK-опосредованного сигнального пути и участие транскрипционного фактора p53 в стимуляции реализации ростового потенциала мезенхимных клеток-предшественников алкалоидом зонгорином. Выявлено повышение уровней стимуляции фибробластного колоние- и кластерообразования и пролиферативной активности мезенхимных предшественников под воздействием специфических ингибиторов JNK и p53. При этом более выраженные эффекты отмечались в отношении ранних предшественников фибробластных КОЕ, что в обоих случаях сопровождалось снижением индекса дифференцировки родоначальных элементов.

Ключевые слова: JNK, p53, алкалоиды, стволовые клетки, регенеративная медицина

Выявленная нами ранее специфика внутриклеточной сигнальной трансдукции в различных типах постнатальных стволовых клеток (СК) послужила основой для разработки нового направления терапии в регенеративной медицине — «Стратегии фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в прогениторных клетках» [1,8,9,12,15]. Избирательное воздействие высокоселективных лекарственных средств на отдельные звенья сигнального каскада, участвующего в прогрессии клеточного цикла и развития прогениторных клеток определенного класса, позволяет рассчитывать на создание принципиально новых способов таргетной терапии дегенеративных заболеваний [4-6]. При этом особый интерес для применения в качестве действующих агентов вызывают алкалоиды [10], широко представленные практически во всех фармакологи-

ческих группах. В подавляющем большинстве случаев это высокоэффективные препараты с избирательным механизмом действия и комплаентными для регенеративной медицины (когда предполагается длительное, в несколько курсов, применение средств) фармакокинетическими параметрами (в том числе высокой биодоступностью при пероральном приеме) [4-6]. Кроме того, некоторые алкалоиды способны легко проникать через клеточные мембраны и оказывать прямое влияние на внутриклеточные структуры.

В НИИФирМ им. Е.Д.Гольдберга был проведен цикл работ по выявлению соединений данной группы, обладающих регенеративной активностью, и определены перспективные для дальнейших исследований вещества [7,10,11,14]. Наиболее выраженной активностью в отношении мезенхимных родоначальных элементов, содержащих в своем составе не только стромальные прекурсоры, но и мультипотентные СК [3,14] (представляющие

максимальный интерес для регенеративной медицины), обладал зонгорин [10]. Однако внутриклеточные пути передачи стимулирующего сигнала данного алкалоида до сих пор во многом не изучены. Несомненную актуальность имеет изучение влияния зонгорина на отдельные сигнальные молекулы, в том числе на JNK и p53 — регуляторы клеточного цикла и апоптоза [1,2].

Целью данной работы являлось изучение роли JNK и p53 в стимуляции функций мезенхимных клеток-предшественников зонгорин в условиях *in vitro*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 2-месячных мышам-самцах линии CBA/Calas ($n=16$) массой 22-24 г. Животные 1-й категории (конвенциональные мыши) получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФирм им. Е.Д.Гольдберга.

Культуральными методами изучали прямое влияние ингибиторов JNK (JNK inhibitor, "InvivoGen") и транскрипционного фактора p53 (Pifithrin- α , Cyclic, "Santa Cruz Biotechnology, Inc.") на рост фибробластных колоние- (КОЕ-Ф) и кластерообразующих (КЛОЕ-Ф) единиц [6,13] в культуре клеток костного мозга *in vitro* при добавлении 5 нг/мл зонгорина (получен из аконита байкальского в НИИФирм им. Е.Д.Гольдберга). Рабочая концентрация ингибиторов *in vitro* была определена в предварительных экспериментах как максимально эффективная и составляла 10 и 5 мкМ соответственно.

Миелокариоциты культивировали в среде, состоявшей из 80% среды DMEM, 20% ЭТС, 280 мг/л L-глутамин, 50 мг/л гентамицин (все компоненты — "Sigma"), в течение 7 сут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности [1,2,13]. Пролиферативную активность КОЕ-Ф исследовали методом клеточного самоуничтожения гидроксимочевинной ("Sigma") после преинкубации миелокариоцитов с ингибиторами в течение 24 ч. Пул КОЕ-Ф, находящихся в S-фазе клеточного цикла, определяли по формуле: $N=[(a-b)/a] \times 100\%$, где a — среднее для группы количество КОЕ-Ф, выросших из клеток, не обработанных гидроксимочевинной; b — среднее для группы количество колоний, выросших из клеток, обработанных гидроксимочевинной. Интенсивность дифференцировки КОЕ-Ф оценивали путем расчета индекса созревания (дифференцировки), определяемого по отношению КЛОЕ-Ф (очаг мезенхимопоза от 5 до 50 клеток) к КОЕ-Ф (более 50 клеток) в культуре ткани [1,9,12,15].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t критерия Стьюдента и непараметрического U критерия Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внесение зонгорина в культуру миелокариоцитов сопровождалось закономерным [7,10,15] увеличением выхода КОЕ-Ф и КЛОЕ-Ф в метилцеллюлозной среде: до 300 и 261.3% от фона (без зонгорина и ингибиторов) соответственно (рис. 1). При этом 76.33% КОЕ-Ф находились в S-фазе клеточного цикла, что составляло 349.7% от аналогичного параметра у интактных КОЕ-Ф, а скорость дифференцировки мезенхимных предшественников достигала 195.9% от фона (рис. 2). Выявленные феномены соответствовали полученным нами ранее сведениям о влиянии ряда алкалоидов атизинового типа на функционирование мезенхимных родоначальных элементов [15].

Изучение киназ-зависимых путей передачи сигнала в родоначальных элементах при воздействии на них алкалоида показало важную роль JNK в определении пролиферативно-дифференцировочного статуса мезенхимных предшественников. При этом специфический ингибитор JNK вызывал, в отличие от характерного для большинства зрелых клеток подавления прогрессии клеточного цикла [1,2], значительное увеличение выхода как наиболее ранних (КОЕ-Ф), так и коммитированных стромальных (КЛОЕ-Ф) [4] элементов (до 766.7 и 437.9% от контроля (среда с зонгорин без ингибитора) соответственно), связанное с повышением их митотической активности (рис. 1). Кроме того, имело место существенное уменьшение индекса дифференцировки КОЕ-Ф (до 50.8% от фона) (рис. 2). Однако, учитывая, что данный индекс является расчетным показателем [8,12], основанным лишь на учете данных о выходе разных видов клеточных образований (КОЕ-Ф и КЛОЕ-Ф), говорить о торможении в условиях стимуляции СК зонгорин данной MAP-киназой их дифференцировки в этом случае не представляется возможным. Обнаруженный феномен следует расценивать как участие JNK в реализации пролиферативного потенциала в большей степени наиболее ранних мезенхимных предшественников.

Аналогичные результаты были получены при исследовании участия транскрипционного фактора p53 в процессах стимуляции клеточного деления прогениторных элементов. Pifithrin- α (представляющий собой обратимый ингибитор p53-опосредованного апоптоза, а также блокатор

транскрипции генов циклина G, p21/waf1 и экспрессии онкогена *MDM2* [1]), значительно повышал выход КОЕ-Ф и КЛОЕ-Ф в культуре клеток костного мозга (до 644.7 и 446.7% от регистрируемых показателей в среде с алкалоидом без агента, влияющего на программируемую гибель клеток, соответственно). Указанные изменения являлись следствием возрастания темпа деления КОЕ-Ф, которое достигало 118.8% от контроля (рис. 2, а). При этом ингибитор p53, как и при использовании блокатора JNK, обладающей проапоптотическим действием [1], приводил к снижению скорости дифференцировки мезенхимных предшественников (рис. 2, б).

Полученные результаты подтверждают уникальную по сравнению со зрелыми клеточными элементами роль JNK в жизнедеятельности родоначальных клеток — ее ингибирующую роль в отношении прогрессии клеточного цикла. Кроме того, выявленные феномены соответствуют данным [1] об инициации p53-зависимых апоптоза и/или торможения репликации ДНК не только в клетках с поврежденным генетическим аппаратом, но и в родоначальных элементах с высокой пролиферативной активностью (связанной с активацией онкогена *MYC* и транскрипционного фактора E2F). При этом JNK и p53 принимают активное участие в реализации функций мезенхимных

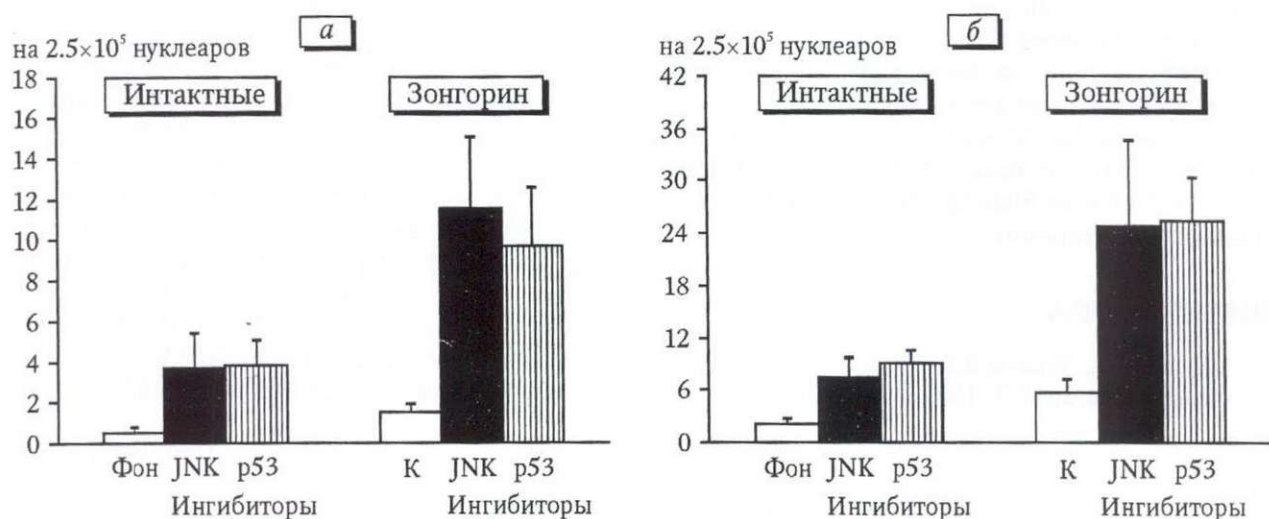


Рис. 1. Количество КОЕ-Ф (а) и КЛОЕ-Ф (б) в культуре интактных миелокарицитов мышей линии СВА/СаLас и при добавлении в среду зонгорина.

Здесь и на рис. 2: К — контроль. Доверительные интервалы при $p=0.05$.

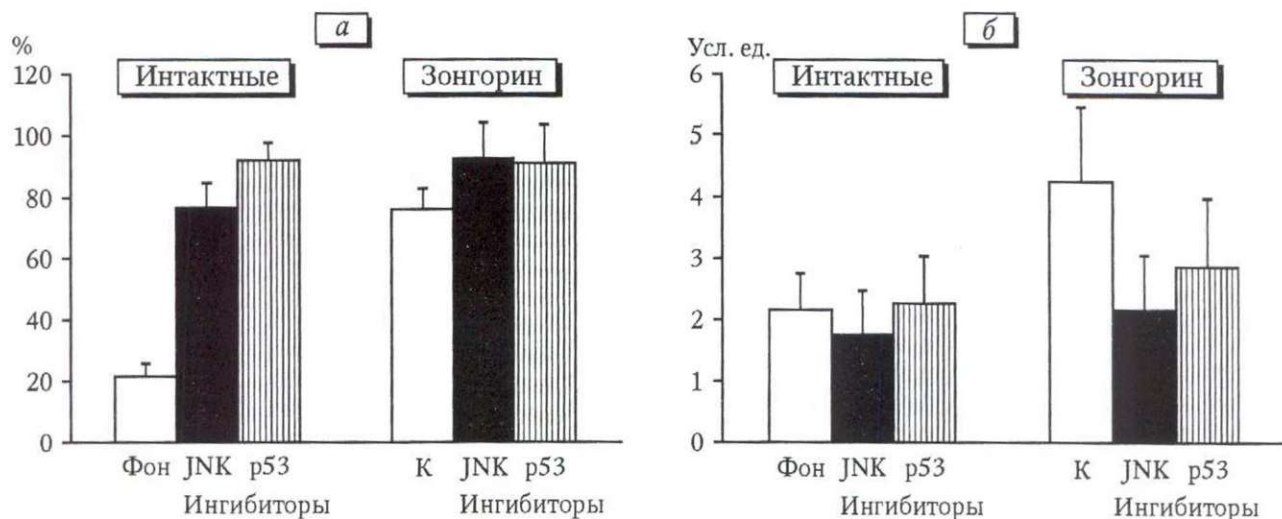


Рис. 2. Пролиферативная активность (доля КОЕ-Ф в S-фазе клеточного цикла) (а) и интенсивность дифференцировки (КЛОЕ-Ф/КОЕ-Ф) (б) мезенхимных предшественников в культуре интактных миелокарицитов мышей линии СВА/СаLас и при добавлении в среду зонгорина.

предшественников под влиянием алкалоида зонгорина [10,15]. Причем в большей степени в отношении мультипотентных клеток, имеющих наибольший регенеративный потенциал [4,11,15]. Кроме того, обнаруженная закономерность (зависимость степени влияния JNK и p53 на функциональное состояние клеток от уровня их зрелости) имеет большое фундаментальное значение для развития "Стратегии фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в прогениторных клетках клеточной терапии" [1,4,7], т.к. свидетельствует о высокой перспективности использования в качестве селективных средств для регенеративной медицины ингибиторов JNK и p53 (даже несмотря на безусловную первоочередную защитную функцию белка p53 в отношении генома [1]).

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых — докторов наук (МД-3096.2015.7) и частично в рамках "Программы повышения конкурентоспособности ТГУ" (Tomsk State University Competitiveness Improvement Program).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Удут Е.В. и др. // Бюл. экспер. биол. 2015. Т. 159, № 2. С. 205-208.
2. Du L., Lyle C.S., Obey T.B. et al. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, N 12. P. 11 957-11 966.
3. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. Vol. 148, N 1. P. 120-125.
4. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. // Stem Cell Rev. 2013. Vol. 9, N 2. P. 140-147.
5. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. Vol. 144, N 6. P. 802-805.
6. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zyuz'kov G.N. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. Vol. 143, N 4. P. 548-551.
7. Zyuz'kov G.N., Chaikovskii A.V., Ligacheva A.A. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, N 1. P. 146-149.
8. Zyuz'kov G.N., Danilets M.G., Ligacheva A.A. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, N 4. P. 436-439.
9. Zyuz'kov G.N., Danilets M.G., Ligacheva A.A. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, N 3. P. 353-356.
10. Zyuz'kov G.N., Krapivin A.V., Nesterova Y.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. Vol. 153, N 6. P. 847-851.
11. Zyuz'kov G.N., Suslov N.I., Losev E.A. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. Vol. 158, N 3. P. 352-354.
12. Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Danilets M.G. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, N 2. P. 224-227.
13. Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Dygai A.M., Gol'dberg E.D. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. Vol. 144, N 6. P. 840-845.
14. Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Uдут E.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. Vol. 155, N 4. P. 439-442.
15. Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Uдут E.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. Vol. 158, N 5. P. 624-627.

Получено 09.04.14