



УДК 577.112.384.4.017

## L-ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА МОДУЛИРУЕТ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HL-60

© 2005 г. Н. В. Гибанова\*, Т. В. Ракитина\*, С. С. Жохов\*, Н. М. Пустошилова\*\*, В. М. Липкин\*, И. А. Костянян\*\*

\*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) ГНЦ ВБ "Вектор", Бердск Новосибирской обл. Поступила в редакцию 18.03.2005 г. Принята к печати 25.04.2005 г.

Показано, что L-глутаминовая кислота повышает устойчивость клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека к цитотоксичному действию фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) за счет ингибирования апоптотического и NF- $\kappa$ B-активирующего каскадов, индуцируемых этим цитокином. В то же время в присутствии L-Glu идет усиление TNF-опосредованного дифференцирующего сигнала, сопровождаемое повышением активности фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы C. Таким образом, открывается перспектива использования L-Glu для снижения общей токсичности и воспалительных процессов при применении TNF- $\alpha$  в качестве терапевтического агента.

*Ключевые слова:* апоптоз; L-глутаминовая кислота; клетки HL-60; клеточная дифференцировка; фактор некроза опухоли альфа; фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза C; транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B.

### ВВЕДЕНИЕ

Различная чувствительность опухолевых недифференцированных и нормальных дифференцированных клеток к апоптозу, вызванному противоопухолевыми агентами, является одним из ключевых аспектов лечения больных различными формами лейкоза [1, 2]. К сожалению, точная взаимосвязь между процессом дифференцировки и апоптозом на сегодняшний день остается невыясненной [3, 4]. С одной стороны, известно, что терминальная дифференцировка миелоидных клеток, как правило, заканчивается апоптозом [5]. В то же время существуют многочисленные данные, свидетельствующие о том, что миелоидные клетки, обработанные известными индукторами дифференцировки, такими, как флороболовые эфи-

ры, полностью-транс-ретиноевая кислота, витамин D<sub>3</sub>, диметилсульфоксид, становятся устойчивыми к различным апоптотическим стимулам, в том числе и к цитотоксическому действию TNF- $\alpha$  [6–12].

TNF- $\alpha$  – плейотропный цитокин, секретируемый многими типами клеток, является хорошо изученным физиологическим индуктором таких клеточных процессов, как дифференцировка, воспаление, а также гибель в результате апоптоза или некроза [13]. Терапевтическое применение TNF- $\alpha$  в качестве противоопухолевого агента осложнено его общей высокой токсичностью для организма из-за воспалительных реакций, связанных с широким спектром биологических активностей этого цитокина [13]. Поэтому одним из подходов к использованию этого цитокина для лечения злокачественных новообразований является поиск агентов, которые снижали бы его токсическое действие на нормальные клетки организма, но позволяли бы сохранять его противоопухолевую активность.

Ранее нами было изучено дифференцирующее действие глутаминовой кислоты на клетки HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека и показано, что на мембране клеток HL-60 нет специфических глутаматных рецепторов [14–16]. Дифференцирующая активность L-Glu связана с уменьшением пролиферирующего сигнала, индуцированного такими цитокинами, как интерлейкины 1 $\beta$  и 6,  $\gamma$ -ин-

Сокращения: PI-PLC – фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза C; PIP<sub>2</sub> – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP<sub>1-3</sub> – инозитолмоно-, ди-, трифосфаты; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (от англ. Tumor Necrosis Factor); TNF-R\* – рецептор TNF- $\alpha$ ; TRADD – белок, содержащий домен смерти, ассоциированный с рецептором (от англ. TNF-R1-Associated Death Domain Protein); FADD – белок, содержащий домен смерти, ассоциированный с Fas (от англ. Fas-Associated Death Domain Protein); TRAF – фактор, ассоциированный с рецептором TNF-R (от англ. TNF Receptor-Associated Factor); RIP – белок, взаимодействующий с рецепторами TNF- $\alpha$  (от англ. Receptor-Interacting Protein); PBS – фосфатно-солевой буфер.

# Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 336-61-66; эл. почта: iakost@mail.ibch.ru).

терферон, а также увеличением дифференцирующей активности TNF- $\alpha$ .

В данной работе, посвященной дальнейшему изучению механизма действия *L*-Glu на клетках HL-60, мы установили, что *L*-Glu снижает цитотоксическую активность TNF- $\alpha$  посредством ингибирования TNF-индуцируемого апоптоза и подавления активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. В то же время усиливается клеточная дифференцировка, о чем свидетельствует повышение активности фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы C [17–19]. Это дает основание предполагать, что совместное применение *L*-Glu и TNF- $\alpha$  при лечении больных острым промиелоцитарным лейкозом может снижать общую токсичность и воспалительные реакции, индуцированные TNF- $\alpha$ , при сохранении противоопухолевой активности этого цитокина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель данной работы – изучение влияния глутаминовой кислоты на цитотоксическую активность TNF- $\alpha$ . Клетки линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека инкубировали с TNF- $\alpha$  или *L*-Glu или со смесью этих агентов и через 4, 24 и 72 ч инкубации определяли количество погибших клеток методом окрашивания трипановым синим. Как видно из рис. 1, *L*-Glu не оказывала влияния на процесс гибели клеток, тогда как обработка фактором некроза опухоли приводила к заметному увеличению числа погибших клеток. При одновременном добавлении *L*-Glu и TNF- $\alpha$  наблюдалось достоверное увеличение устойчивости клеток к TNF- $\alpha$ -индуцированной гибели. Эти данные были подтверждены цитофлуориметрическим анализом (двойным окрашиванием FITC-меченным аннексином V и пропидиййодидом) клеток HL-60 после 16 ч инкубации. Было установлено, что TNF- $\alpha$  увеличивает количество аннексин-V-позитивных клеток, т.е. клеток, в которых произошла индукция апоптоза, в то время как *L*-Glu индуктором апоптоза не является. При одновременной обработке клеток этими веществами апоптотический эффект TNF- $\alpha$  значительно снижался (таблица).

Для изучения механизма апоптотической гибели мы исследовали влияние глутаминовой кислоты и фактора некроза опухоли на активацию эффекторной каспазы-3, общепризнанного маркера апоптоза, а также каспазы-8 – основной инициаторной каспазы рецепторного апоптотического каскада [20]. Активация каспазы-3 и каспазы-8 наблюдалась только после обработки клеток фактором некроза опухоли и снижалась до контрольного уровня в присутствии *L*-Glu (рис. 2).

Известно, что во многих клеточных системах TNF- $\alpha$  вызывает не только индукцию апопто-

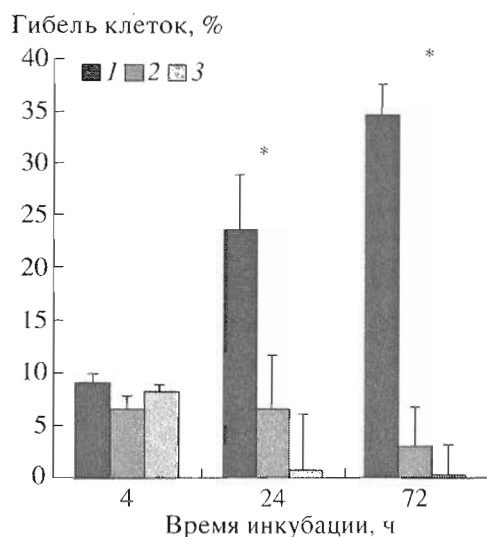
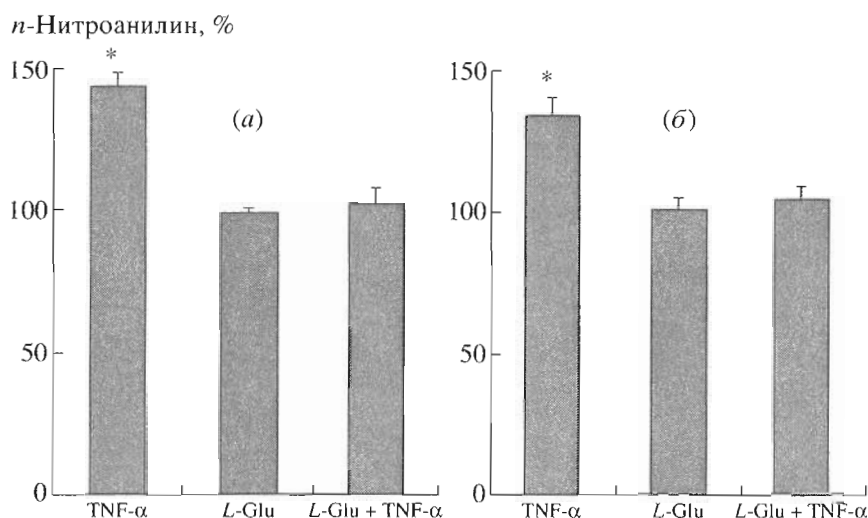


Рис. 1. Зависимость числа погибших клеток HL-60 при инкубации с TNF- $\alpha$  (1) или *L*-Glu (2), а также при их совместном присутствии (3). Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$ S.D. Звездочкой отмечен статистически достоверный результат ( $P < 0.05$ ).

ческого каскада, но и активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, который контролирует экспрессию многих генов, в том числе регулирующих пролиферацию, воспаление и апоптоз [12]. Это происходит в результате того, что после связывания с TNF- $\alpha$  активированный рецептор TNF-R1 формирует два белковых комплекса: DISC или “комплекс смерти”, состоящий из адаптерных белков TRADD, FADD и прокаспазы-8, и сигнальный комплекс, включающий TRADD, адаптерные белки TRAF2, RIP и киназы, иницирующие активацию NF- $\kappa$ B [21]. Каскад реакций, приводящих к индукции NF- $\kappa$ B, включает фосфорилирование регуляторных киназ IKK $\alpha$  и IKK $\beta$ , которые, в свою очередь, фосфорилируют белок I $\kappa$ B – ингибитор транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Это приводит к высвобождению и транслокации в ядро активных субъединиц NF- $\kappa$ B – RelA/p65 и RelB/p68. Транскрипционная активность фактора

Влияние TNF- $\alpha$  и *L*-Glu на количество апоптотических клеток, окрашенных FITC-меченным аннексином V и пропидиййодидом, определенных с помощью цитофлуориметрического анализа. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$ S.D.

Индуктор	Апоптотические клетки, %
Контроль	4.6 $\pm$ 0.36
TNF- $\alpha$	20.4 $\pm$ 1.63
<i>L</i> -Glu	9.5 $\pm$ 0.76
TNF- $\alpha$ + <i>L</i> -Glu	7.2 $\pm$ 0.58



**Рис. 2.** Изменение активности каспазы-3 (а) и каспазы-8 (б) при действии TNF- $\alpha$  и L-Glu, определенное колориметрически по появлению *n*-нитроанилина. (Количество образовавшегося *n*-нитроанилина в контрольном образце принимали за 100%.) По оси ординат – количество *n*-нитроанилина по отношению к контролю. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$ S.D. в трех независимых повторах. Звездочкой отмечен статистически достоверный результат ( $P < 0.05$ ).

NF- $\kappa$ B коррелирует со степенью фосфорилирования RelA/p65 по остатку серина 536 [22].

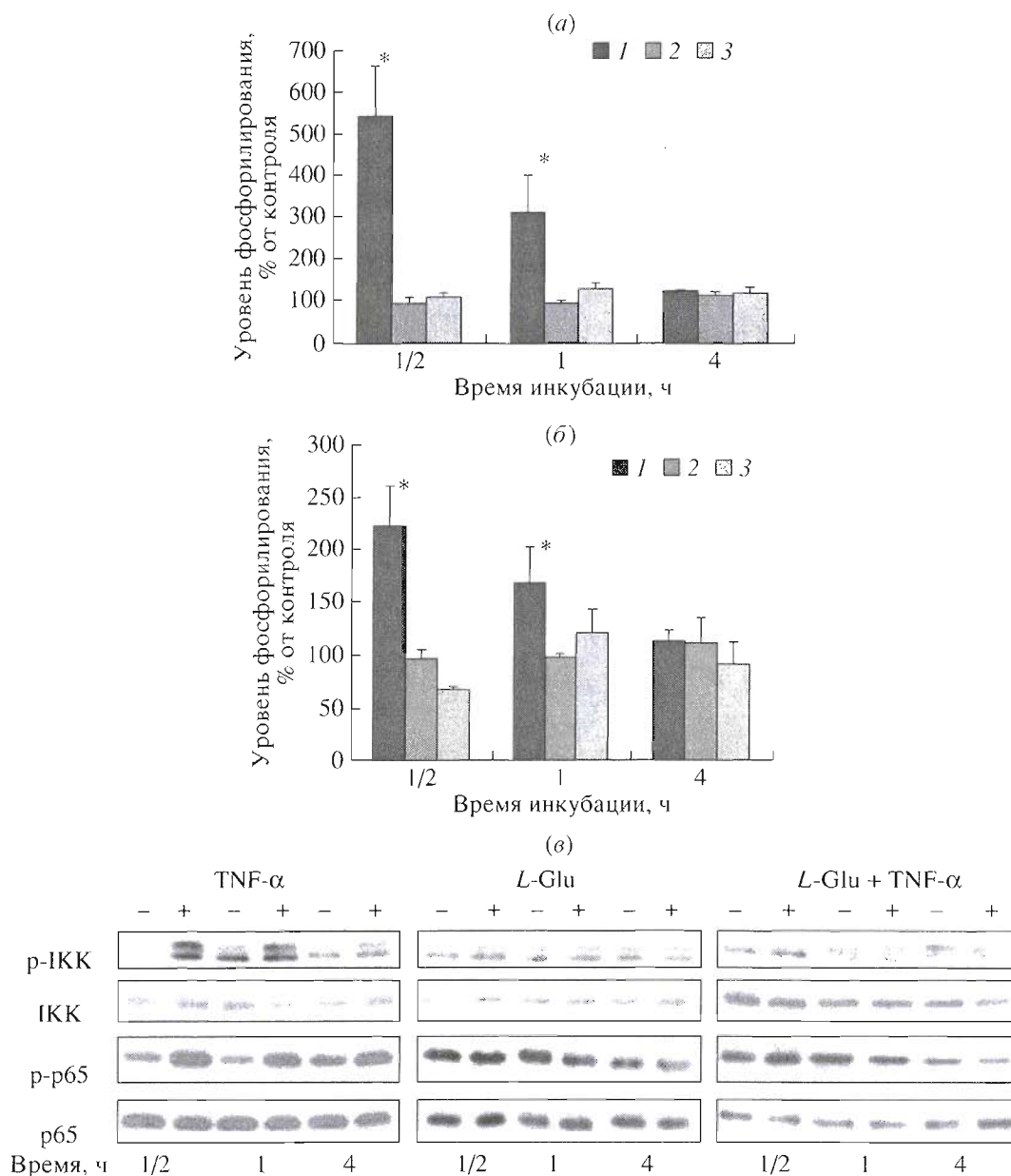
Мы изучили влияние TNF- $\alpha$  и L-Glu на индукцию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в клетках линии HL-60. Активацию NF- $\kappa$ B оценивали по увеличению уровня фосфорилирования регуляторных киназ (ИКК  $\alpha$ ,  $\beta$ ) и транскрипционно-активной субъединицы RelA/p65 методом иммуоблоттинга суммарных клеточных лизатов после инкубации с TNF- $\alpha$ , L-Glu или их смесью в течение 30 мин, 1 и 4 ч. Полученные данные (рис. 3а) свидетельствуют о том, что инкубация клеток HL-60 с TNF- $\alpha$  в течение 30 мин и 1 ч приводит к значительному повышению уровня фосфорилирования комплекса киназ ИКК приблизительно в 5 и 3 раза, соответственно, тогда как при инкубации в течение 4 ч уровень фосфорилирования снижается до контрольного уровня. В присутствии глутаминовой кислоты процесс фосфорилирования ИКК, индуцируемый TNF- $\alpha$ , полностью ингибируется. Аналогичные результаты были получены при оценке степени фосфорилирования RelA/p65 (рис. 3б). Следует отметить, что уровень экспрессии белков комплекса киназ ИКК и RelA/p65 в ходе инкубации не изменялся (рис. 3в).

Исходя из полученных данных и ранее опубликованных результатов [14–16], следует, что L-Glu ингибирует одновременно оба каскада, индуцируемых TNF- $\alpha$  – апоптотический и NF- $\kappa$ B-активирующий, в то же время усиливая дифференцирующий эффект этого цитокина. Поэтому следующим этапом наших исследований был поиск механизма передачи дифференцирующего сигнала в клетке. Известно, что при ингибировании TNF-R-индуциру-

емого апоптотического каскада происходит активация 4-фосфат-5-киназы (PIP5K), которая продуцирует субстрат PIP<sub>2</sub> для фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы C (PI-PLC) [23], а активация фосфолипазы C является одним из ключевых событий дифференцирующего сигнального пути в клетках линии HL-60 [17–19]. Основываясь на этих литературных данных, мы изучили влияние L-Glu и TNF- $\alpha$  на активность PI-PLC, которую оценивали по изменению суммарной внутриклеточной концентрации инозитолмоно- и дифосфатов (IP и IP<sub>2</sub>). Инозитолтрифосфат (IP<sub>3</sub>), образующийся при гидролизе PIP<sub>2</sub>, нестабилен и разлагается до IP<sub>2</sub>. Как видно из рис. 4, TNF- $\alpha$  не влиял на активность фосфолипазы C, глутаминовая кислота незначительно активировала PI-PLC, однако одновременная стимуляция TNF- $\alpha$  и L-Glu существенно повышала активность этого фермента. Следовательно, в присутствии L-Glu идет усиление TNF-опосредованной активации фосфолипазы C, что указывает на запуск процесса дифференцировки клеток этой линии.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что в основе протекторного действия глутаминовой кислоты лежит ее способность блокировать апоптотический и NF- $\kappa$ B-активирующий каскады, индуцируемые TNF- $\alpha$ , и тем самым, подавлять гибель клеток и развитие воспалительных процессов. Кроме того, увеличение активности PI-PLC при совместном действии L-Glu и TNF- $\alpha$  усиливает дифференцирующий эффект этого цитокина.

Полученные нами данные также дают основание предполагать, что совместное применение L-Glu и



**Рис. 3.** Изменение уровня фосфорилирования регуляторного комплекса киназ IKK (а) и субъединицы RelA/p65 (б) при инкубации клеток HL-60 с TNF- $\alpha$  (1) или L-Glu (2) или со смесью этих агентов (3) в течение 30 мин, 1 и 4 ч. (в) – Иммуноблот-анализ комплекса киназ IKK и RelA/p65 и их фосфорилированных форм, где видно, что уровень экспрессии этих белков не менялся. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$ S.D. Звездочкой отмечен статистически достоверный результат ( $P < 0.05$ ).

TNF- $\alpha$  при лечении больных острым промиелоцитарным лейкозом может снижать общую токсичность и воспалительные реакции, индуцированные TNF- $\alpha$ , при сохранении противоопухолевой активности этого цитокина. Кроме того, обнаруженная нами способность L-Glu блокировать активацию фактора транскрипции NF- $\kappa$ B открывает перспективу использования этой аминокислоты при лечении аутоиммунных заболеваний, характеризующихся повышенной активностью TNF- $\alpha$ . Ранее уже было показано, что при

лечении пациентов, страдающих ревматоидным артритом и заболеваниями, связанными с воспалением слизистой кишечника (болезнь Крона), с применением агентов, нейтрализующих действие TNF- $\alpha$ , наблюдалось значительное улучшение клинической картины [24, 25].

Ранее нами уже было показано отсутствие специфических глутаматных рецепторов на поверхности клеток HL-60 [14–16]. При этом L-Glu уменьшала рецепцию цитокинов, регулирующих пролиферацию (интерлейкины 1 $\beta$  и 6,  $\gamma$ -интерфе-

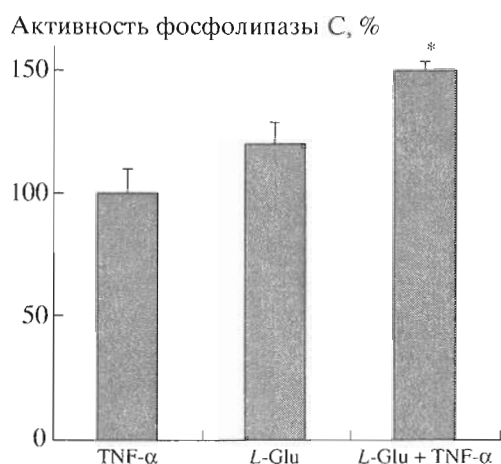


Рис. 4. Изменение активности фосфолипазы С при действии TNF- $\alpha$  и L-Glu. По оси ординат – концентрация IP и IP<sub>2</sub> по отношению к контролю, выраженная в процентах. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$ S.D. Звездочкой отмечен статистически достоверный результат ( $P < 0.05$ ).

рон), в то же время увеличивая количество мест связывания TNF- $\alpha$  на поверхности клетки. Однако экспрессия рецепторов TNF- $\alpha$  при этом достоверно не изменялась, что было установлено нами методом полуколичественной конкурентной ПЦР (данные не представлены), а формирование сигнальных комплексов TNF-R, индуцирующих апоптотический и NF- $\kappa$ B-активирующий каскады, блокировалось.

Недавно было обнаружено, что рецепторы семейства TNF-R используют липидные микродомены клеточной мембраны (lipid rafts) в качестве сигнальной платформы, а нарушение структуры таких липидных участков агентами, вызывающими истощение холестерина, препятствует образованию апоптотического и NF- $\kappa$ B-активирующего комплексов [26–28]. Мы предполагаем, что механизм действия L-Glu также связан с ее возможным влиянием на структуру липидных микродоменов плазматической мембраны или их окружение, что приводит к изменению уровня связывания цитокинов со своими рецепторами и модулирует эффективность проведения пострецепторных сигналов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: L-глутаминовая кислота, среда RPMI 1640, фетальная сыворотка телят (Sigma, Германия); человеческий рекомбинантный фактор некроза опухоли TNF- $\alpha$  (Вектор, НИКТИ БАВ). Все остальные реактивы имели квалификацию “ос. ч.”. Клеточная линия HL-60 была любезно предоставлена Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва).

**Культивирование клеток HL-60** проводили в среде RPMI 1640 с 10% фетальной сывороткой телят при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Уровень клеточной гибели** определяли методом окрашивания трипановым синим. Клетки HL-60 ( $5 \times 10^6$ ) инкубировали в течение 4, 24 и 72 ч с TNF- $\alpha$  (1 мкг/мл) или L-Glu (0.1 мкмоль/мл) или со смесью этих агентов в таких же концентрациях. После инкубации аликвоты клеточной суспензии окрашивали трипановым синим как описано в работе [29]. Клеточную гибель оценивали по разнице числа окрашенных клеток в опытном образце и контроле и выражали в процентах. Контролем служили клетки, инкубируемые с 10 мМ PBS (pH 7.4). Проведено не менее трех независимых экспериментов в трех повторах.

**Апоптоз в клетках контролировали цитофлуориметрическим методом** с помощью набора “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (PharMingen, США) на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США). Клетки инкубировали в течение 16 ч в присутствии исследуемых эффекторов, затем промывали холодным PBS и окрашивали FITC-меченным аннексином V и пропидиййодидом в соответствии с инструкцией производителя. Контролем служили клетки, инкубируемые с 10 мМ PBS (pH 7.4).

**Активность клеточных каспаз-8, -3** оценивали по количеству *n*-нитроанилина (pNA), появляющегося в результате гидролиза модифицированных субстратов каспазы-3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA) и каспазы-8 (Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-pNA) при помощи набора реактивов “Caspase-3, -8 Assay Kit, Colorimetric” (Sigma, США). Клетки HL-60 ( $5 \times 10^6$  клеток) инкубировали в течение 24 ч в присутствии исследуемых агентов как описано выше. После этого лизировали буфером, содержащим 50 мМ HEPES, pH 7.4, 1 мМ дитиотреитол, 0.1 мМ EDTA, 0.1% CHAPS и 0.1% Тритон X-100. К суммарному клеточному лизату ( $\sim 400 \times 10^3$  клеток) добавляли субстраты каспаз до конечной концентрации 200 мкМ, согласно инструкции производителя. Объем реакционной смеси составлял 100 мкл. Инкубацию с субстратами проводили в течение 2 ч при 37°C. Поглощение *n*-нитроанилина определяли при 405 нм ( $\epsilon 10.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) на приборе Multiskan MCC/340 (Labsystem, Финляндия). Результаты выражали в процентах, принимая количество образовавшегося *n*-нитроанилина в контрольном образце (в отсутствие TNF- $\alpha$  и L-Glu) за 100%. Эксперименты проводили не менее 3 раз.

**Иммуноблоттинг.** После инкубации в течение 30 мин, 1 и 4 ч клетки ( $5 \times 10^6$ ), обработанные исследуемыми веществами, осаждали, промывали холодным PBS и ресуспендировали в лизирующем буфере (0.125 М Трис-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% глицерин, 0.2 М дитиотреитол, 0.2% бромфе-

полового синего). Аликвоту клеточного лизата 10 мкл ( $\sim 200 \times 10^3$  кл.), предварительно прогретого при 100°C в течение 7 мин, подвергали электрофоретическому разделению в 10% SDS-ПААГ-геле с последующим переносом на мембрану из иммобилона P (Millipore, США). После инкубации в течение 1 ч в буфере PBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока, мембраны инкубировали с первичными антителами (1 : 1000) в течение ночи при 4°C. После отмывки мембраны в течение 1 ч обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США) (1 : 3000). Степень связывания с антителами оценивали по хемилюминесценции на радиоавтографической пленке с помощью набора реактивов "ECL+Plus detection system" (Amersham Biosciences, США). Антитела к  $\beta$ -актину использовали для оценки количества суммарного белка. Использовали следующие первичные поликлональные антитела: к  $\beta$ -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), к комплексу киназ ИКК и к фосфорилированной форме этого комплекса (p-ИКК), к субъединице RelA/p65 и фосфорилированной форме (p-RelA/p65) (Cell Signaling Technology, США). Полученные радиоавтограммы обрабатывали с помощью программы Scion Image for Windows b.4.0.2. Результаты представляли в процентах по отношению к контрольному уровню.

**Активность фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы С** определяли по внутриклеточному содержанию фосфатных производных инозитола. Клетки инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл *tho*-[ $^3\text{H}$ ]инозитола (Amersham Biosciences, США), затем дважды промывали буфером, содержащим 10 мМ HEPES-NaOH, 5.6 мМ глюкозы, 154 мМ NaCl, 5.6 мМ KCl, 1.3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 3.6 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4 (раствор Locke's). Клеточный осадок ресуспендировали в этом же буфере, содержащем 20 мМ LiCl. К полученной суспензии клеток добавляли равный объем буфера, содержащий 2 мкг/мл TNF- $\alpha$ , 0.2 мкмоль/мл L-Glu или смесь этих агентов при таких же концентрациях. Далее клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После удаления инкубационной смеси клетки лизировали 0.1 М HCl при комнатной температуре в течение 20 мин. Инозитолмоно- и дифосфаты выделяли методом ионообменной хроматографии на колонке с сорбентом Dowex AG 1  $\times$  8 (Serva, Германия) [30]. Элюцию проводили буферным раствором, содержащим 1 М формиат аммония и 0.1 М муравьиную кислоту. Количество  $^3\text{H}$ -меченных IP<sub>1</sub> и IP<sub>2</sub> определяли с использованием сцинтилляционного счетчика Beckman LS 9800 (Beckman Instruments Inc., США).

**При статистической обработке** результатов достоверность различий между опытом и контролем оценивали по критерию Стьюдента.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Хайдукову Сергею Валерьевичу (ИБХ РАН) за помощь в проведении цитофлуориметрического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов по молекулярной и клеточной биологии Российской академии наук и грантов Министерства науки РФ № НШ 312.2003.4 и МНТЦ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wickremasinge R.G., Hoffbrand A.V. // *Blood*. 1999. V. 93. P. 3587–3600.
2. James S.Y., Williams M.A., Newland A.C., Colston K.W. // *Gen. Pharmacol.* 1999. V. 32. P. 143–154.
3. Cotter T.G., Fernandes T.S., Verhaegen S., McCarthy J.M. // *Immunol. Rev.* 1994. V. 142. P. 93–112.
4. Ketley N.J., Allen P.D., Kelsey S.M., Newland A.C. // *Blood*. 1997. V. 90. P. 4578–4587.
5. Martin S.J., Bradley J.G., Cotter T.G. // *Clin. Exp. Immunol.* 1990. V. 79. P. 448–453.
6. Solary E., Bertrand R., Kohn K.W., Pommier Y. // *Blood*. 1993. V. 81. P. 1359–1368.
7. Sordet O., Beltaieb A., Bruey J.M., Eymen B., Droin N., Ivarsson M., Garrido C., Solary E. // *Cell. Death. Differ.* 1999. V. 6. P. 351–361.
8. Zwelling L.A., Chan D., Hinds M., Mayes J., Silberman L.E., Blick M. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 6625–6633.
9. Kikuchi H., Iizuka R., Sugiyama S., Gon G., Mori H., Arai M., Mizumoto K., Imajoh-Ohmi S. // *J. Leukoc. Biol.* 1996. V. 60. P. 778–783.
10. Wu Y.L., Jiang X.R., Allen P.D., Jia L., Dronfield D.M., Newland A.C., Kelsey S.M. // *Leuk. Res.* 1996. V. 20. P. 47–55.
11. Del Bino G., Li X., Traganos F., Darzynkiewicz A. // *Leukemia*. 1994. V. 8. P. 281–288.
12. Vondracek J., Sheard M.A., Krejci P., Minksova K., Hofmanova J., Kozubik A. // *J. Leuk. Biol.* 2001. V. 69. P. 794–802.
13. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. // *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. P. 45–65.
14. Костанян И.А., Наволоцкая Е.В., Нуриева Р.И., Астапова М.В., Драницына С.М., Завьялов В.П., Липкин В.М. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 3–9.
15. Kostanyan I.A., Nurieva R.I., Navolotskaya E.V., Astapova M.V., Dranitsina S.M., Bogachuk A.P., Zav'jalov V.P., Lipkin V.M. // *Immunol. Lett.* 1998. V. 62. P. 9–13.
16. Астапова М.В., Липкин В.М., Архипова М.В., Андреева С.Г., Драницына С.М., Меркулова М.И., Нуриева Р.И., Наволоцкая Е.В., Костанян И.А. // *Биоорганическая химия*. 1999. Т. 25. С. 816–820.
17. Whetton A.D., Heyworth C.M., Nicholls S.E., Evans C.A., Lord J.M., Dexter T.M., Owen-Lynch P.J. // *J. Cell Biol.* 1994. V. 125. P. 651–659.
18. Nicholls S.E., Heyworth C.M., Dexter T.M., Lord J.M., Johnson G.D., Whetton A.D. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. P. 845–853.

19. Neri L.M., Martelli A.M., Colamussi P., Borgatti P., Marchisio M., Capitani S. // *FASEB J.* 1999. V. 13. P. 2299–2310.
20. Degterev A., Boyce M., Yuan J. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 8543–8567.
21. Gupta S. // *J. Clin. Immunol.* 2002. V. 22. P. 185–194.
22. Vermeulen L., Wilde G.D., Notebaert S., Berghe W.V., Haegeman G. // *Biochem. Pharmacology.* 2002. V. 64. P. 963–970.
23. Castellino A.M., Parker G.J., Boronenkov I.V., Anderson R.A., Chao M.V. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 5861–5870.
24. Taylor P.C., Peters A.M., Paleolog E., Chapman P.T., Elliott M.J., McCloskey R., Feldmann M., Maini R.N. // *Arthritis. Rheum.* 2000. V. 43. P. 38–47.
25. Blam M.E., Stein R.B., Lichtenstein G.R. // *Am. J. Gastroenterol.* 2001. V. 96. P. 1977–1997.
26. Legler D.F., Micheau O., Doucey M.A., Tschopp J., Bron C. // *Immunity.* 2003. V. 18. P. 655–664.
27. Doan J.E., Windmiller D.A., Riches D.W. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 7654–7660.
28. Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsieng R.Y., Lenardo M.J. // *Science.* 2000. V. 288. P. 2354–2357.
29. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. // *Int. Rev. Cytol.* 1980. V. 68. P. 251–306.
30. Baek S.H., Seo J.K., Chae C.B., Suh P.G., Ryu S.H. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 8170–8175.

## **L-Glutamic Acid Modulates the Cytotoxic Effect of Tumor Necrosis Factor on the HL-60 Cell Line**

**N. V. Gibanova\*, T. V. Rakitina\*, S. S. Zhokhov\*,  
N. M. Pustoshilova\*\*, V. M. Lipkin\*, and I. A. Kostanyan\*\***

\*Phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 336-6166; e-mail: iakost@mail.ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Research and Technology Institute of Biologically Active Substances, Vector State Scientific Center for Virology  
and Biotechnology, alya 112, Berdsk, Novosibirsk oblast, 633190 Russia

*L*-Glutamic acid was shown to increase the stability of cells of the HL-60 line of human promyelocyte leukemia to the cytotoxic action of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) due to the inhibition of apoptotic and NF- $\kappa$ B-activating cascades induced by this cytokine. At the same time, *L*-glutamic acid increases the TNF- $\alpha$ -mediated differentiating signal and the accompanying enhancement of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity. Therefore, it is a promising agent for the reduction of total toxicity and inflammatory processes during treatment with TNF- $\alpha$ . The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* apoptosis, cellular differentiation, *L*-glutamic acid, HL-60 cells, NF- $\kappa$ B transcription factor, phosphatidylinositol-specific phospholipase C, tumor necrosis factor alpha