

На правах рукописи
УДК 577.27:591.81

И. Мальшева

МАЛЬШЕВА
Ирина Евгеньевна

**ПРОЦЕССЫ МОДУЛЯЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК K562
ПРИ ОБРАБОТКЕ ИНДУКТОРАМИ ЭРИТРОИДНОЙ
И МИЕЛОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

03.00.25 - Гистология, цитология и клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА-2005

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии, биологической и органической химии Петрозаводского Государственного университета и в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского Научного Центра Российской Академии Наук.

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор

НЕМОВА
Нина Николаевна

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук

ЗАХАРОВА
Людмила Алексеевна

доктор биологических наук,
профессор

ОНИЩЕНКО
Галина Евгеньевна

Ведущая организация: Кафедра цитологии и гистологии
Санкт-Петербургского Государственного университета

Защита состоится "16" марта 2005 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 002.238.01 в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

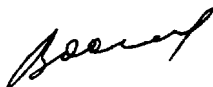
Замечания и отзывы по данной работе, заверенные печатью, в двух экземплярах просим направлять по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, Диссертационный Совет.

Факс: (095)135-80-12

E-mail: volina@proxima.idb.ac.ru

Автореферат разослан" _____ " _____ 2005г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета, к. б. н.



Волина Е. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Апоптоз является физиологическим механизмом устранения избыточных и/или функционально аномальных клеток, необходимым как для нормального развития многоклеточного организма в эмбриональном периоде, так и для поддержания тканевого гомеостаза у взрослых особей (Фильченков, 2003). Нарушения механизмов индукции апоптоза, приводящие к его ингибированию или, наоборот, к излишнему активированию, могут быть важным фактором патогенеза различных заболеваний, в том числе онкологических.

Известно, что многие цитостатические агенты, используемые в химиотерапии опухолей человека, способны индуцировать дифференцировку клеток опухолей *in vivo* и опухолевых линий *in vitro*, в ряде случаев сопровождающуюся запуском в них апоптотических процессов (Волкова и др, 2003; Mengubas et al., 1996; Robertson et al., 1997; Terui et al., 1998). Опухоли гематоэтической системы представляют собой наиболее яркий пример сохранения дифференцировочного статуса нормальных клеток при их неопластической трансформации (Клиническая онкогематология, 2001). Например, клетки K562, сохраняют фенотип незрелых предшественников эритроидного, мегакариоцитарного и моноцито/макрофагального путей клеточной дифференцировки (Drew et al., 1977; Ekblom et al., 1983) и поэтому в ответ на действие соответствующих индукторов, во многих случаях способны дифференцироваться в указанных направлениях практически до зрелых форм. Так, обработка клеток K562 рядом нуклеозидов, адриамицином и другими соединениями приводит к индукции эритроидного пути клеточной дифференцировки (Parodi et al., 1988; Jeannesson et al., 1997). Другие индукторы, например, форбол-12-миристат-13-ацетат, дексаметазон способны усилить мегакариоцитарную или моноцито/макрофагальную дифференцировку клеток K562 (Butler et al., 1990).

Во многих экспериментальных системах, где используются вышеуказанные дифференцирующие агенты, а также диметилсульфоксид, бутират натрия имеет место запуск апоптотических процессов (Mengubas et al., 1996; Robertson et al., 1997; Bernhardt et al., 1999). Однако следует отметить, что индукция апоптоза опухолевых клеток сопряжена с рядом определенных трудностей, поскольку для большинства опухолевых клеток характерными являются генетические изменения, ведущие к нарушению процессов дифференцировки и к пониженной восприимчивости со стороны апоптоз-индуцирующих сигналов, кроме того, прогрессирующие во времени. Подобный эффект связан, например, в клетках K562 с биаллельной инактивацией опухолевого супрессора p53, образованием химерного гена bcr-abl и

соответствующего белка p210^{bcr-abl}, обладающего антиапоптотической активностью (Lubbert et al., 1988; Ray et al., 1996; Ceballos et al., 2000), а также постепенным развитием множественной лекарственной устойчивости. В зависимости от условий обработки клеток опухолевых линий наряду с индуцирующим апоптоз эффектом может наблюдаться подавление клеточной смерти, вызванное другим дифференцирующим агентом. В настоящее время известно, что диметилсульфоксид способен подавлять апоптоз в В-клеточных линиях человека (Lin et al., 1995), а также в клетках линии HL-60 (Nishizawa et al., 1998). В ряде экспериментальных систем антиапоптотической активностью обладает форбол-12-миристат-13-ацетат, препятствуя церамид-опосредованному апоптозу (Oberg et al., 1993).

В настоящее время установлено, что к числу первостепенных биохимических маркеров апоптоза относится изменение активности некоторых клеточных ферментов, в частности каспаз (caspases, cysteinyl aspartate-specific proteases). Модуляция активности этих ферментов является ключевым фактором в процессах индукции/ингибирования апоптоза. Кроме того, показано, что некоторые каспазы способны трансактивироваться при индукции других клеточных процессов, например, дифференцировки (Pandey et al., 2000). Пандей и соавт. (Pandey et al., 2000) показали, что при дифференцировке клеток линии U937, индуцированной ТРА (12-О-тетрадеcanoилфорболацетат), происходит выход цитохрома С из митохондрий и активация каспазы 3. Поскольку ингибитор каспазы 3 z-VAD-FMK блокирует дифференцировку клеток моноцитарного ряда требуется активация каспаз. При дифференцировке клеток промиелоцитарного лейкоза HL-60 и клеток остеосаркомы, индуцированной ретиноевой кислотой и три-терпеноидом (CDDO) соответственно, также отмечено увеличение функциональной активности каспаз 3, 8 и 9 (Doule et al., 2002; Ito et al., 2001). Поэтому изучение регуляции таких клеточных функций как пролиферация, дифференцировка и апоптоз на уровне вторичных и третичных мессенджеров а также поиск химических соединений, способных регулировать указанные клеточные функции, представляет несомненный интерес не только в изучении специфики развития и функционирования опухолевой клетки, но и для ведения эффективной терапии онкологических и многих других заболеваний человека.

Цель настоящего исследования заключалась в проведении сравнительного анализа биологического действия нескольких групп химических реагентов на индукцию или ингибирование процессов дифференцировки и апоптоза эритролейкемических клеток человека K562. В качестве специфических групп химических реагентов нами были использованы: нуклеозиды (тимидин, цитидин,

гуанозин), соли жирных кислот с укороченной цепью (бутират натрия, изобутират натрия, изовалерат натрия), гормоны кортикостероидной природы и их синтетические производные (гидрокортизон, преднизолон, дексаметазон), константные активаторы протеинкиназы С (форбол-12-миристан-13-ацетат), а также N-оксидированные производные ряда хинолина (2-DQO, 4-DQO, 4-NQO, 2-NSQO, 4-NSQO) и пиридина (DPyO).

В задачи исследования входило:

1. Изучить цитотоксический и антипролиферативный эффекты индукторов дифференцировки на клетки K562. Определить EC₅₀ изучаемых соединений.

2. Установить, на основе данных по токсичности, дифференцирующее и апоптогенное действия исследуемых индукторов и их комбинаций на клетки K562. Определить основные маркеры эритроидного и миелоидного путей дифференцировки опухолевых клеток.

3. Изучить влияние вышеуказанных групп химических реагентов на модуляцию активности каспаз в клетках K562 как возможных участников расхождения путей передачи сигнала от процессов дифференцировки к апоптозу клеток.

4. Исследовать *in vitro* процессы биотрансформации новосинтезированных N-оксидированных производных хинолина и пиридина клеточными гем-содержащими ферментами - микросомальными монооксигеназами и пероксидазой. Определить влияние на данные процессы митохондриального цитохрома С.

5. Изучить взаимовлияние N-оксидированных производных хинолина и пиридина на процессы окисления и восстановления цитохрома С как одного из основных посредников передачи сигнала апоптоза в клетке. Установить условия возможного выхода цитохрома С из митохондрий в системе *in vitro*.

6. Выявить возможный механизм индукции апоптоза новосинтезированными N-оксидами хинолина и пиридина в клетках K562, основываясь на результатах комплексной оценки биологического действия данных гетероциклов.

Научная новизна. В результате проведенных нами исследований установлено, что каспазы принимают непосредственное участие не только в реализации процессов апоптоза, но и дифференцировки клеток K562. В частности, при обработке опухолевых клеток нуклеозидами имеет место индукция эритроидной дифференцировки, активация каспаз 3 и 9 (но не каспазы 6) и запуск процессов апоптоза. В отличие от используемых нуклеозидов, РМА не индуцирует фрагментацию ДНК в клетках K562. Однако в обработанных РМА клетках наблюдается повышение активности каспазы 3 и 6 и индукция моноцито/макрофагальной дифференцировки.

Активность каспазы 9 в данном случае остается на уровне необработанных клеток. Нами впервые показано, что переключение процессов клеточной дифференцировки с одного пути на другой, например, с эритроидного (индуцированного нуклеозидами) на моноцито/макрофагальный или мегакариоцитарный (индуцированный РМА) влечет за собой переключение работы каспаз и модуляцию процессов апоптоза в клетках K562. Так, при использовании в сочетании с нуклеозидами РМА, наблюдается внутриклеточная активация каспазы 6, значимое снижение активности каспазы 3, инактивация каспазы 9 и ингибирование РМА нуклеозид-индуцированного апоптоза.

Впервые нами предпринята попытка определить возможный механизм апоптогенного действия N-окислованных производных хинолина (2-NSQO, 4-NSQO, 2-DQO) и пиридина (DPyO) на клетки K562. Установлено, что в данный путь реализации программы апоптоза вовлечены митохондриальный цитохром C, каспазы 9 и 3. Показано, что клеточная активация гетероциклов происходит при участии микросомальных монооксигеназ. Кроме того, изучаемые ксенобиотики могут существенно тормозить реакции окисления, но не восстановления митохондриального цитохрома C. Нами также установлено, что в зависимости от преобладания в цитоплазме клеток окисленной или восстановленной форм цитохрома C, процессы микросомального окисления ксенобиотиков замедляются или ускоряются, что в свою очередь может вносить определенный вклад в реализацию процессов апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выполненная работа представляет как теоретический, так и практический интерес в области клеточной биологии и молекулярной медицины. Полученные данные, направленные на изучение с использованием модельной системы механизмов сигнальных путей, регулирующих взаимосвязь на уровне вторичных мессенджеров таких клеточных процессов как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, позволят использовать этот факт в разработке новых методов лечения опухолей, а именно, в подборе оптимальных схем цитостатиков и их комбинаций для достижения наилучшего терапевтического эффекта. Поскольку действие большинства химиотерапевтических агентов направлено на поражение клеток опухолей *in vitro* через индукцию процессов дифференцировки и/или апоптоза, то накопление сведений о внутриклеточных мишенях и механизмах действия используемых химических реагентов позволит максимально точно изучить запуск и протекание различных путей дифференцировки клеток и программированной клеточной гибели (ПКГ).

Кроме того, результаты исследований могут быть использованы в учебных курсах по молекулярной биологии, для написания учебных и методических пособий, а также монографической литературы.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на VIII Всероссийском симпозиуме "Биология клетки в культуре" (С-Петербург, 2001), Международной конференции "Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере" (Сургут, 2002), V Международном симпозиуме "Химия протейолитических ферментов" (Москва, 2002), 6^{ой}, 7^{ой} и 8^{ой} Путинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука 21^{го} века" (Пушино, 2002, 2003, 2004), III Съезде Биохимического общества (С-Петербург, 2002), Всероссийской конференции "Проблемы медицинской энзимологии" (Москва, 2002), Научной конференции "Карелия и РФФИ" (Петрозаводск, 2002), XVI Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (С-Петербург, 2002), V Конгрессе РААКИ (Москва, 2002), I Съезде Общества клеточных биологов (С-Петербург, 2003).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения и четырех разделов (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение), заключения и выводов общим объемом 185 страниц машинописного текста. В работу входит 35 рисунков и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 50 отечественных и 396 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Состоит из трех глав, отражающих сведения об основных особенностях структурной и функциональной организации лейкозных клеток, о влиянии различных соединений на процессы дифференцировки и апоптоза опухолевых клеток, охарактеризованы основные пути реализации ПКГ.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы клетки человеческой эритромиелолойкозной линии К562 (Всероссийский банк клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

1. Клетки культивировали в полной среде: 89% RPMI 1640 с добавлением 11% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина сульфата, 50 мкМ 2-меркаптоэтанол. Культуры засевали в 1мл (3 мл) среды при начальной плотности посева $10^5/10^6$ клеток/лунку соответственно, и инкубировали в течение 1-4 сут в присутствии (или без) изучаемых химических реагентов.

2. Численность клеток К562 подсчитывали с помощью камеры Горяева. Процент жизнеспособности оценивали по тесту с трипановым синим.

3. Определение внутриклеточной концентрации гемоглобина (маркер эритроидной дифференцировки) проводили с помощью бензидиновой пробы (Andersson et al., 1979).

4. Фенотипирование маркеров моноцито/макрофагальной (мегакариоцитарной) дифференцировки клеток K562 проводили с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (CD 14, CD41), меченых ФИТЦ (Jackson, Warner, 1986).

5. Оценку фагоцитирующей способности стимулированных дифференцирующими агентами клеток K562 (НСТ-тест) проводили по методу Парк и сотр. (Park et al., 1988).

6. Определение характера повреждений ДНК (1-й 2-нитевые разрывы) проводили по изменению параметров флуоресценции двух ДНК-тропных красителей: бромистого этидия (EtBr) и 4', 6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Иванов, 1992; Анисимов и др., 1999а). ДНК в нуклеоидном виде получали по методу (Cook, Brazell, 1978). Измерения проводили на приборе ФМ-Ц-2. Находили $\Delta EtBr$ и $\Delta DAPI$, характеризующие изменение флуоресценции красителей при связывании с ДНК по формуле:

$$\Delta EtBr (\Delta DAPI) = I_1 - I_2 - (I_3 - I_4), \text{ где}$$

I_1 - интенсивность флуоресценции пробы, содержащий клеточный лизат и EtBr (DAPI); I_2 - интенсивность флуоресценции клеточного лизата; I_3 - интенсивность флуоресценции EtBr (DAPI); I_4 - интенсивность флуоресценции буфера.

7. Определение активности каспаз проводили стандартным методом согласно прилагаемой инструкции с использованием специфических субстратов, меченных флуоресцентной меткой (7-амино-4-трифлуоро-метилкумарин - AFC), детектируемой по изменению оптической плотности. Клетки K562 (10^6 клеток) снимали с лунок микропланшет, дважды отмывали фосфатным буфером, добавляли 50 мкл литического буфера, приготовленного смешиванием 920 мкл $H_2O_{дист.}$, 40 мкл 25х реакционного буфера и 10 мкл каждого из четырех ингибиторов: ФМСФ (фенилметансульфонилфторида) (35 мг/мл), пепстатина А (1 мг/мл), аprotинина (1 мг/мл) и лейпептина (1 мг/мл). 25х реакционный буфер включал: 250 мМ ХЕПЕС, рН 7.4, 50 мМ ЭДТА, 2.5% ЧАПС, 125 мМ дитиотреитол. Далее клетки трижды замораживали в атмосфере жидкого азота, затем клеточный лизат центрифугировали на микроцентрифуге при 17 000 G ($4^\circ C$) в течение 30 мин, собирали супернатант (образец). Определение активности каспаз 3,6,7,9 и 10 проводили в реакционном буфере путем смешивания образца и соответствующего специфического субстрата. Субстрат для каспаз 3, 7, 10 - DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), для каспазы 9 - LETD (Leu-Glu-Thr-Asp), для каспазы 6 - VEID (Val-Glu-Ile-Asp). Определение количества отщепленного AFC проводили на СФ-46 при 395 нм через 30,60, 90, 120, 150, 180 мин после начала реакции. Далее строили график изменения активности каспаз в зависимости от времени инкубации образца и соответствующего субстрата.

8. Определение EC_{50} клеток, инкубированных с реагентами, проводили по методу Тсуруо и др. (Tsuruo et al., 1981).

9. Определение суммарной внутриклеточной концентрации никотинамидных коферментов $[NAD^{\pm} \pm NADH]$ проводили по методу Ниссельбаума и Грина (Nisselbaum, Green, 1969).

10. Активность микросомальных монооксигеназ по отношению к N-содержащим производным ряда хинолина и пиридина изучали *in vitro* путем регистрации изменения оптической плотности растворов ксенобиотиков при действии обозначенной группы ферментов. Микросомальную фракцию выделяли из клеток печени самцов крыс линии "Вистар" неинбредного разведения (Щепеткин, 1999). Концентрацию белка в пробе определяли спектрофотометрически на СФ-46 и биуретовым методом (Досон и др., 1991). Измерение оптической плотности ксенобиотиков проводили на КФК-3 при λ 430 нм. Для изучения реакций биотрансформации N-содержащих гетероциклов микросомами в контрольную пробу помещали: 3 мл фосфатного буфера (pH 7.4), 2 мкл микросомальной фракции, 3 мкл $H_2O_{дист.}$. В опытную пробу: 3 мл фосфатного буфера (pH 7.4), 2 мкл микросомальной фракции и 3 мкл раствора одного из гетероциклов: 2-DQO ($10^{-5}M$), DPyO ($10^{-5}M$), 2-NSQO ($10^{-5}M$), 4-NSQO ($10^{-5}M$). Показания снимали в течение 1 часа с интервалом каждые 5 мин. На основании полученных результатов строили графики зависимости изменения оптической плотности изучаемых реагентов в присутствии микросом от времени инкубации. Параллельно была проведена серия экспериментов по изучению процессов биотрансформации N-оксидов пероксидазой.

11. Изучение влияния цитохрома С на процессы биотрансформации 2-DQO, DPyO, 2-NSQO, 4-NSQO микросомальными монооксигеназами проводили по следующей схеме. Для анализа процессов взаимопревращения окисленной формы цитохрома С в восстановленную использовали спектрофотометрический метод исследования. Регистрацию изменения оптической плотности реакционной смеси проводили на СФ-46 в диапазоне длин волн от 300 нм до 590 нм. Изучение реакций биотрансформации указанных N-оксидов микросомальной фракцией проводили на КФК-3 при λ 430 нм.

а) Восстановление цитохрома С цистеином или аскорбиновой кислотой проводили, инкубируя смесь в течение 30 минут при $37^{\circ}C$. Далее снимали спектр восстановленной формы цитохрома С (максимумы поглощения восстановленной формы цитохрома С - 553 нм (а), 524 (в), 415 (γ)) (Диксон, Уэбб, 1982).

б) Окисление восстановленной формы цитохрома С проводили в присутствии пероксидазы или феррицианида калия в течение 2 минут. Далее снимали

спектр окисленной формы белка (максимумы поглощения окисленной формы цитохрома С - 550 нм (α), 521 нм (β), 407 нм (γ)) (Диксон, Уэбб, 1982).

в) Влияние 2-DQO и DPyO на процессы окисления и восстановления цитохрома С проводили в обозначенных выше условиях (см. п. а и б) после 15-ти минутной преинкубации цитохрома С с указанными реагентами. В качестве контроля использовали пробы, не содержащие цитохром С.

г) Биотрансформацию стирильных производных N-оксидов пиридина (DPyO) и хинолина (2-DQO, 2-NSQO, 4-NSQO) проводили гемсодержащими ферментами (пероксидазой и цитохромом P-450) по методу, описанному в п. 10, но в присутствии цитохрома С. На протяжении всей реакции регистрировали изменение оптической плотности N-оксидов до стабилизации показаний. В качестве контроля использовали пробы, не содержащие гетероциклов.

12. Выделение интактных митохондрий из клеток печени крыс для подбора и изучения условий выхода цитохрома С из внутреннего пространства органелл во внешнюю среду проводили по методу Короткова и Лапина (Коротков, Лапин, 2003). Процессы набухания-сжатия митохондрий в гипо- (0.015 М), изо- (0.15 М) и гипертоническом (1.5 М) растворах KCl, в присутствии или без CaCl₂, MgCl₂, ряда ксенобиотиков (новокаин, доксициклин), а также в условиях понижения pH среды до 6.6 оценивали, измеряя светорассеивание суспензии в режиме турбидиметрии (на пропускание) или нефелометрии (на рассеянный свет). Все измерения проводили при концентрации митохондриального белка 1.5 мг/мл среды инкубации. Концентрация сахаразы в пробах составляла 250 мМ. Выход цитохрома С из органелл регистрировали спектрофотометрически на СФ-46.

Достоверность полученных результатов оценивали по t-критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модуляция пролиферации и жизнеспособности клеток K562 при работе рядом химических реагентов.

На первом этапе исследований нами были изучены цитотоксический и антипролиферативный эффекты используемых в настоящей работе химических реагентов на клетки линии K562. Определена EC₅₀ ряда изучаемых соединений.

Результаты исследований показали, что инкубация клеток K562 в течение 1-4 сут с нуклеозидами (1-3 мМ тимидина, цитидина и гуанозина) приводила к дозо- и время-зависимому снижению темпа пролиферации

указанных клеток. На 2-е сут инкубации с 2 мМ тимидина и 2 мМ гуанозина, и на 4-е сут с 2 мМ цитидина численность клеток K562 составляла: 138.33 ± 0.39 , 95.33 ± 0.47 и 358.24 ± 0.81 тыс. клеток на лунку, соответственно. Уровень пролиферации необработанных реагентами клеток ко 2-м и 4-м суткам инкубации достигал значений: 229.33 ± 0.31 и 723.58 ± 0.97 тыс. на лунку. Жизнеспособность клеток при обработке нуклеозидами в большинстве вариантов не падала ниже 85 %. Жизнеспособность контрольных клеток составила $97.9010.31$ %.

Снижение или полное подавление пролиферации регистрировалось при обработке клеток K562 в течение 1-4 сут натриевыми солями жирных кислот (1-3 мМ бутирата натрия, изобутирата натрия и изовалерата натрия). Так, к 4-м сут инкубации с 3 мМ бутирата натрия численность и жизнеспособность клеток K562 снижалась на 87.65 и 23.59 %%, по сравнению с необработанными клетками.

Используемые в работе системные кортикостероиды (гидрокортизон, преднизолон, 10 мкМ) в период 1-4 сут инкубации не оказывали значимого влияния на численность и жизнеспособность клеток K562. В то время как дексаметазон (10 мкМ) к 4-м сут на 65% снижал численность (257.20 ± 1.46 тыс. клеток/лунку) и до 89% жизнеспособность опухолевых клеток в культуре. При обработке клеток K562 дексаметазоном в сочетании с эритроидными индукторами (нуклеозиды, соли жирных кислот) жизнеспособность клеток падала до 60-70 %.

Подавление численности клеток K562 в культуре отмечено при 2-х суточной обработке 100 нМ РМА ($p < 0.05$). К 4-м сут инкубации данный показатель по сравнению с необработанными клетками снижался до 87.67 ± 0.69 тыс. клеток на лунку ($p < 0,01$). Жизнеспособность клеток при обработке РМА, а также комбинациями РМА с эритроидными индукторами (нуклеозиды, соли жирных кислот) составляла порядка 70-80 %.

N-окисидированные производные хинолина (2-DQO, 4-DQO, 4-NQO, 2-NSQO, 4-NSQO) и пиридина (DPyO), ко 2-м сут инкубации значительно подавляли пролиферацию клеток K562. Максимальную токсичность по отношению к клеткам в данных условиях проявлял DPyO (EC₅₀ составила 33.11 мкМ). Наименьшей токсичностью обладал 4-NSQO (EC₅₀ 303.50 мкМ).

Из полученных результатов следует, что структурно-родственные химические реагенты могут оказывать различный токсический эффект на клетки K562, что во многом определяется спецификой строения соединения. Поэтому для изучения дифференцирующего и апоптогенного действия использованных в настоящей работе реагентов были подобраны концентрации веществ, при которых жизнеспособность клеток K562 не падала ниже 80-90 %.

Модуляция дифференцировки клеток K562 при обработке рядом химических реагентов

Изучена способность обозначенных выше групп химических реагентов (при единичной обработке и в комбинациях) модулировать процессы эритроидной и миелоидной (мегакариоцитарной и/или моноцито/макрофагальной) дифференцировки клеток K562.

Показано, что используемые нуклеозиды в течение 2-х и 4-х суточной обработки стимулировали в клетках K562 эритроидную дифференцировку (увеличение синтеза гемоглобина) (рис. 1). На основе полученных результатов было предположено, что биологические эффекты нуклеозидов могут проявляться на уровне ферментов синтеза и распада нуклеиновых кислот, в частности рибонуклеотидредуктазы и тимидинкиназы.

Синтез гемоглобина в клетках K562 возрастал на 2-е сут инкубации при обработке 2 мМ и 3 мМ бутирата натрия ($p < 0.01$), и на 3-е сут с 3 мМ изобутирата натрия и 3 мМ изовалерата натрия ($p < 0.05$). На рис. 2 представлены данные по изменению [Hb], в клетках K562, обработанных в течение 4-х сут 2 мМ бутирата, изобутирата и изовалерата натрия.

Среди используемых кортикостероидов в концентрации 10 мкМ значимое влияние на базальный и индуцированный нуклеозидами и натриевыми солями жирных кислот синтез гемоглобина в клетках K562 оказывал дексаметазон. На 4-е сут инкубации с указанным реагентом [Hb]_i в опухолевых клетках снижалась до 0.149 ± 0.002 мкг/ 10^5 клеток по сравнению с контролем 0.169 ± 0.002 мкг/ 10^5 клеток ($p < 0.05$).

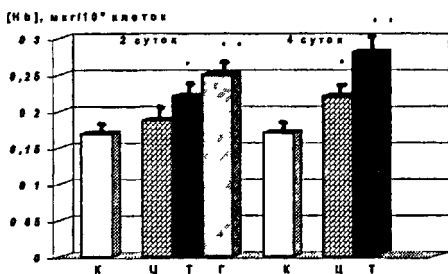


Рис. 1. Кинетика синтеза гемоглобина в эритролейкемических клетках K562 инкубированных в присутствии 2 мМ цитидина, 2 мМ тимидина и 1 мМ гуанозина в течение 2-х и 4-х суток инкубации.

К - необработанные индукторами клетки (контроль), Ц - клетки, культивируемые с 2 мМ цитидина, Т - с 2 мМ тимидина, Г - с 1 мМ гуанозина

* достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.05$)

* * достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.01$)

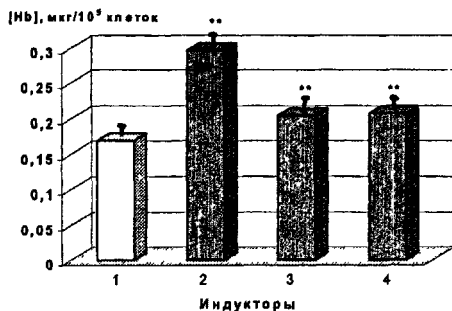


Рис. 2. Концентрация гемоглобина в клетках K562, инкубированных в присутствии 2 мМ бутирата натрия, 2 мМ изобутирата натрия и 2 мМ изовалерата натрия в течение 4-х суток.

1 - необработанные индукторами клетки (контроль), 2 - клетки, культивируемые с 2 мМ бутирата натрия, 3 - с 2 мМ изобутирата натрия, 4 - с 2 мМ изовалерата натрия
 ** достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.01$)

[Hb], в опухолевых клетках при обработке в течение 2-х сут комбинациями: тимидин (2 мМ) ± дексаметазон (10 мкМ) и бутират натрия (2 мМ) ± дексаметазон (10 мкМ), снижалась на 21.5 и 23.1 %, соответственно по сравнению с тимидин- и бутират-обработанными клетками.

Ингибирование дексаметазоном эритроидной дифференцировки клеток K562 может являться следствием запуска работы генов другого пути дифференцировки, например, моноцито/макрофагального. Согласно полученным нами данным (табл. 1), при обработке дексаметазоном на поверхности клеток значимо увеличивалась экспрессия антигенов моноцито/макрофагальной (CD 14) и мегакариоцитарной (CD41) дифференцировки.

Таблица 1.
 Процент клеток K562, экспрессирующих CD14- и CD41-антигены после инкубации с гидрокортизоном, преднизолоном и дексаметазоном в течение 4-х суток

Реагент	CD14 ⁺ -клетки, %	CD41 ⁺ -клетки, %
Контроль	36.3±1.9	11.7±1.8
Гидрокортизон (10 мкМ)	38.1±1.7	11.9±1.5
Преднизолон (10 мкМ)	38.9±2.1	14.8±2.7
Дексаметазон (10 мкМ)	45.8±1.7*	19.8±1.6*

Примечание * достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.05$)

По результатам НСТ-теста, обработка клеток K562 в течение 4-х сут 10 мкМ дексаметазона сопровождалась увеличением кислород-зависимой фагоцитарной активности клеток на 43.9%, по сравнению с контролем - 7.30 ± 0.25 усл. ед. акт. Увеличение кислород-зависимой фагоцитарной активности опухолевых клеток (на 14.3%) также имело место на 4-е сут при инкубации с 10 мкМ преднизолона. Однако, в условиях культивирования с преднизолоном или гидрокортизоном процент клеток, экспрессирующих CD14- и CD41-антигены, значимо не изменялся (табл. 1).

Показано, что ингибирующее действие на синтез гемоглобина как на фоне индукторов эритроидной дифференцировки, так и в их отсутствие оказывал PMA. К 4-м сут инкубации со 100 нМ PMA [Hb], в клетках K562 снижалась до 0.097 ± 0.004 мкг/ 10^5 клеток, по сравнению с контролем - 0.169 ± 0.003 мкг/ 10^5 клеток ($p < 0.01$). При обработке опухолевых клеток в течение 4-х сут комбинациями: PMA (100 нМ) \pm тимидин (2 мМ), PMA (100 нМ) \pm бутират натрия (2 мМ) [Hb], снижалась на 36.2 и 35.4 %, по сравнению с тимидин- и бутират-обработанными клетками. Подавление эритроидного фенотипа связано с индукцией миелоидного пути дифференцировки клеток K562. При инкубации в течение 4-х сут с PMA (100 нМ) на поверхности клеток значимо возрастала экспрессия CD14- и CD41-антигенов: 49.4 ± 2.8 и 20.2 ± 1.9 %, по сравнению с необработанными клетками - 36.3 ± 1.9 и 11.7 ± 1.8 %, соответственно ($p < 0.05$). Имело место также достоверное увеличение кислород-зависимой фагоцитарной активности клеток ($p < 0.05$).

N-оксидированные производные хинолина и пиридина, оказывали различные эффекты на процессы дифференцировки клеток K562. Индукция эритроидной дифференцировки отмечена при инкубации клеток в течение 2-х сут с 0.1 мкМ 2-NSQO и 0.1 мкМ 4-NSQO (0.183 ± 0.003 и 0.177 ± 0.004), и в течение 4-х сут с 0.1 мкМ DPyO (0.202 ± 0.004), по сравнению с необработанными клетками - 0.167 ± 0.003 и 0.169 ± 0.002 мкг/ 10^5 клеток, соответственно ($p < 0.05$). 2-DQO и 4-DQO в концентрации 0.1 мкМ не обладали дифференцирующей активностью, 4-NQO (1 нМ), напротив, стимулировал дифференцировку клеток K562 в миелоидном направлении. После инкубации в течение 4-х сут с 1 нМ 4-NQO процент клеток, экспрессирующих CD14- и CD41-антигены значимо возрастал ($p < 0.05$). Различные эффекты, оказываемые обозначенными реагентами на процессы дифференцировки клеток K562, в первую очередь могут быть связаны с различными путями метаболической активации соедине-

ний, которые основываются на специфике структуры вещества, например, на наличии специфической функциональной группы - донорной ($(-N(CH_3)_2)$) или акцепторной ($(-NO_2)$), в составе стирильного "хвоста" изучаемого N-оксида.

Согласно результатам исследования, дифференцирующее действие вышеобозначенных групп химических реагентов на клетки K562 в первую очередь определяется внутриклеточными механизмами действия соединений, в результате которых активируются (или ингибируются) группы генов определенного пути дифференцировки. Несмотря на структурное различие используемых в работе веществ, их дифференцирующие эффекты на клетки K562 могут быть однотипны. Итогом подобного действия во многих случаях является запуск апоптоза в опухолевых клетках. Кроме того, ПКГ может индуцироваться в клетках независимо от дифференцировки.

В настоящее время известно, что одними из основных участников апоптоза являются клеточные каспазы. При апоптозе происходит последовательная активация нескольких групп каспаз: инициаторные каспазы трансактивируют эффекторные каспазы, которые в свою очередь гидролизуют белковые субстраты клетки (Фильченков, 2003). Однако данная группа ферментов может активироваться в клетке при реализации других процессов, например, дифференцировке, пролиферации.

Модуляция активности каспаз и запуск апоптоза в клетках K562 при обработке индукторами эритроидной и миелоидной дифференцировки

Далее нами были изучены временные и дозовые зависимости запуска процессов апоптоза в клетках K562 при обработке исследуемыми химическими реагентами, а также их комбинациями.

Обработка клеток в течение 2-х сут тимидином и гуанозином приводила к значимому увеличению активности каспаз 3,7,10 (рис. 3а). Кроме того, в данном варианте имела место активация каспазы 9. Незначительная активация каспазы 9 и каспаз 3,7,10 в клетках K562 при инкубации с 2 мМ цитидина отмечена на 4-е сут. Во всех исследуемых вариантах активация указанных каспаз коррелирует с запуском в клетках эритроидной дифференцировки. Значимое увеличение флуоресценции DAPI и EtBr при связывании с ДНК клеток, снижение $[NAD^{\pm} \pm NADH]$, ($p < 0.05$) наблюдалось на 2-е сут инкубации клеток с 3 мМ тимидина, 1 мМ гуанозина и на 4-е с 2 мМ тимидина ($p < 0.05$). При обработке цитидином незначительное увеличение флуоресценции DAPI (но не EtBr) по сравнению с контрольными пробами регистрировалось к 4-м сут инкубации клеток K562 только с 3 мМ данного нуклеозида (ADAPI для опытной пробы - 37.30 ± 0.10 ; для контрольной - 36.40 ± 0.11).

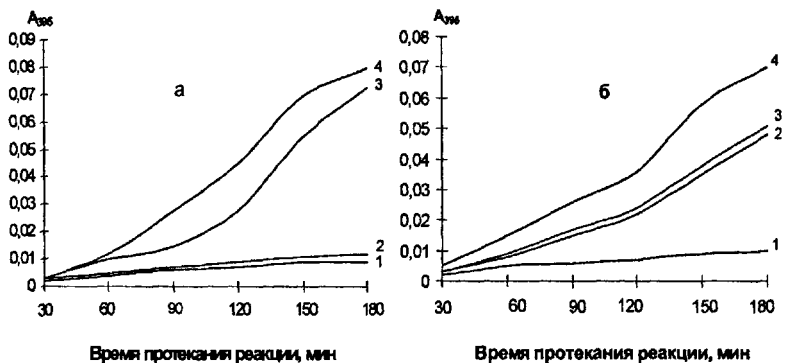


Рис. 3. Изменение активности каспаз 3, 7, 10 в клетках K562, обработанных нуклеозидами (а) и натриевыми солями жирных кислот (б) в течение 2-х суток инкубации.

По оси ординат: изменение поглощения опщепленного AFC, определенное на СФ-46 при λ 395 нм

1 - базовый уровень активности каспаз 3,7,10 для нестимулированных клеток (контроль), 2 - активность каспаз 3, 7, 10 в клетках, обработанных 2 мМ цитидина (а), 2 мМ изобутирата натрия (б); 3 - активность каспаз 3,7,10 в клетках, обработанных 2 мМ тимидина (а), 2 мМ изовалерата натрия (б), 4 - активность каспаз 3, 7,10 в клетках, обработанных 1 мМ гуанозина (а), 2 мМ бутирата натрия (б).

В случае использования в качестве эритроидных индукторов бутирата, изобутирата и изовалерата натрия достоверное повышение активности каспаз 3, 7, 10 имело место на 4-е сут культивирования клеток с реагентами (рис. 36). Увеличение флуоресценции обоих ДНК-тропных красителей наблюдалось к 4-м сут инкубации клеток K562 только с 3 мМ бутирата натрия ($p < 0.05$). В вариантах обработки 3 мМ изобутирата натрия и 3 мМ изовалерата натрия на протяжении 4-х сут параметры флуоресценции DAPI и EtBr, а также концентрация никотинамидных коферментов в опухлевых клетках достоверно не отличались от контрольных значений.

Активность каспаз 3, 7, 10 после инкубации опухолевых клеток с 10 мкМ гидрокортизона, преднизолона и дексаметазона в течение 2-х сут значимо не изменялась ($p > 0.05$). Гидрокортизон и преднизолон в использованных нами условиях не индуцировали фрагментацию ДНК в клетках K562 в течение 4-х сут инкубации ($p > 0.05$). В то время как при обработке клеток дексаметазоном (10 мкМ) на 4-е сут параметры флуоресценции обоих ДНК-тропных красителей значимо возрастали ($p < 0.05$). При добавлении к клеткам K562 дексаметазона (5 мкМ) в сочетании с эритроидными индукторами (тимидин, бутират натрия, 2 мМ) наблюдалось инги-

бирование эритроидной дифференцировки, значимое увеличение активности каспаз 3, 7, 10 и фрагментация ДНК. Увеличение активности указанных каспаз ($p < 0.01$) регистрировалось также при 2-х суточной обработке опухолевых клеток комбинацией преднизолона (10 мкМ) и бутирата натрия (2 мМ), в то время как при инкубации клеточных культур только с преднизолоном, подобного эффекта не обнаружено.

В нашей системе РМА (100 нМ) не индуцировал фрагментацию ДНК в клетках K562. Однако в обработанных РМА клетках наблюдалось повышение активности каспаз 3 и 6, что может быть связано с индукцией миелоидного пути дифференцировки клеток.

Показано, что форболовый эфир подавлял апоптоз в клетках K562, индуцированный нуклеозидами или солями жирных кислот (бутиратом натрия). При использовании РМА в сочетании с нуклеозидами, как и в случае единичной обработки РМА, в клетках K562 наблюдалось значимое увеличение активности каспазы 6 (рис.4).

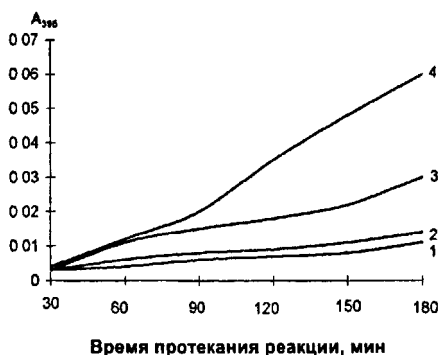


Рис. 4. Изменение активности каспазы 6 в клетках K562, обработанных РМА, тимидином, а также комбинацией тимидина с РМА в течение 2-х суток инкубации.

По оси ординат изменение поглощения отщепленного AFC, определенное на СФ-46 при λ 395 нм

1 - базовый уровень активности каспазы 6 для нестимулированных клеток (контроль), 2 - активность каспазы 6 в клетках, обработанных 3 мМ тимидина, 3 - активность каспазы 6 в клетках, обработанных 100 нМ РМА, 4 - активность каспазы 6 в клетках, обработанных 3 мМ тимидина \pm 100 нМ РМА

Уровень активности каспаз 3 и 9, напротив, падал в среднем на 64 и 79 %%, соответственно, по сравнению с клетками, обработанными 3 мМ тимидина в течение 2-х сут (данные не представлены). При замене в ком-

бинации тимидина на гуанозин или цитидин имела место аналогичная закономерность. Обработка клеток K562 в течение 2-х сут тимидином (3 мМ) и гуанозином (1 мМ) приводила к значимому усилению флуоресценции DAPI и EtBr ($p < 0.05$). При использовании в комбинации с тимидином PMA имело место достоверное снижение флуоресценции DAPI и EtBr ($p < 0.05$), а в системе гуанозин \pm PMA только EtBr ($p < 0.05$). В остальных вариантах флуоресценция красителей не отличалась от соответствующего контроля. Не исключено, что именно с таким перераспределением функций клеточных каспаз в данном случае связано ингибирование PMA нуклеозид-индуцированного апоптоза.

В клетках K562, обработанных N-оксидами (2-NSQO, 4-NSQO, 2-DQO, DPyO) в течение 2-х сут имело место увеличение активности каспаз 9 и 3, 7, 10.

На рис. 5 представлены данные по изменению активности каспазы 9 в клетках K562 обработанных в течение 1-х сут инкубации 2-NSQO и 4-NSQO.

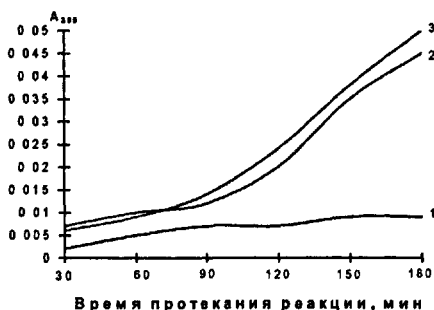


Рис. 5. Изменение активности каспазы 9 в клетках K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO в течение 1-х суток инкубации.

По оси ординат изменение поглощения отщепленного AFC, определенное на СФ-46 при λ 395 нм

1 - базовый уровень активности каспазы 9 для нестимулированных клеток (контроль), 2 - активность каспазы 9 в клетках, обработанных 1 мкМ 4-NSQO, 3 - активность каспазы 9 в клетках, обработанных 1 мкМ 2-NSQO

В случае использования других обозначенных N-окисированных производных наблюдалась аналогичная закономерность.

Все используемые N-оксиды индуцировали образование 1- и 2-нитевых разрывов в молекуле ДНК. Однако в случае использования DPyO достоверное увеличение флуоресценции красителя при связывании с ДНК имело место только в вариантах с DAPI (табл. 2) Определение

внутриклеточной концентрации никотинамидных коферментов на 2-е сут инкубации показало достоверное снижение $[NAD^{\pm} \pm NADH]$, во всех вариантах обработки клеток K562 исследованными соединениями ($p < 0.05$), что также коррелирует с запуском в них процессов апоптоза.

Из представленных результатов следует, что исследуемые N-оксиды проявляют по отношению к клеткам K562 выраженное апоптогенное действие. Не исключено, что активация каспаз в данном случае необходима в первую очередь для успешного протекания процессов апоптоза, что согласуется с результатами по фрагментации ДНК опухолевых клеток в условиях обработки вышеуказанными химическими реагентами. Однако следует отметить, что из-за высокой цитотоксической активности N-оксидов разделить процессы дифференцировки и апоптоза во времени на уровне обозначенных каспаз достаточно сложно.

Таблица 2.

Параметры $\Delta EtBr$ и $\Delta DAPI$ нуклеоидов клеток K562, обработанных стирильными производными N-оксидов хинолина и пиридина в течение 2-х суток инкубации

Реагент	$\Delta DAPI$	$\Delta EtBr$
Контроль	37.17±0.14	6.14±0.09
2-DQO (1 мкМ)	58.12±0.72**	13.35±0.80*
4-DQO (1 мкМ)	49.43±0.74*	12.08±0.64*
DPyO (1 мкМ)	44.28±0.81*	6.94±0.98
2-NSQO (1 мкМ)	46.01±0.39*	8.28±0.10*
4-NSQO (1 мкМ)	43.19±0.14*	7.33±0.09*

Примечание. Клетки K562 инкубировали в 96-луночных микропланшетах по 0 02 млн клеток/луночку.

* достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.05$)

** достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0.01$).

Таким образом, несмотря на специфику используемых химических индукторов, итоговый биологический эффект их действия на клетки может быть совершенно одинаков или отличаться, т. е. в реализации конкретной клеточной функции принимают участие различные сигнальные пути клетки, воздействуя на которые можно определенным образом регулировать направление протекания клеточного процесса в ту или иную сторону. С другой стороны, одни и те же участники сигнальных путей клетки могут выполнять роль ключевых звеньев модуляции различных клеточных функций, например, дифференцировки и апоптоза. Нами показано, что одними из таких ключевых участников процессов являются клеточные каспазы.

Производные N-оксидов хинолина и пиридина являются интересными соединениями с точки зрения их биологической активности, поскольку

образуют широкий спектр метаболитов при внутриклеточной биотрансформации. Известно, что при попадании в клетку многие ксенобиотики подвергаются биотрансформации под действием монооксигеназ и других специфических ферментов. В настоящей работе нами были проведены эксперименты, направленные на изучение *in vitro* активности микросомальных ферментов при действии на N-содержащие гетероциклы (2-DQO, DPyO, 2-NSQO, 4-NSQO).

Согласно полученным данным, при обработке обозначенных N-оксидов микросомами наблюдались интенсивные процессы их биотрансформации *in vitro*. При этом, несмотря на структурную аналогию используемых химических реагентов, процессы биотрансформации протекали по-разному, что может быть связано со специфическим расположением функциональных групп относительно гетероцикла.

Нами также было изучено влияние исследуемых гетероциклов на модуляцию активности микросомальных NADPH-оксидоредуктаз (рис. 6).

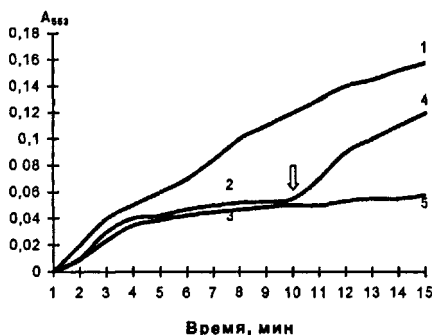


Рис. 6. Кинетика восстановления цитохрома С микросомами клеток K562 без (1) и в присутствии 10 мкМ 2-NSQO (2-5).

Цитохром С и NADPH добавляли сразу после введения в суспензию микросом 2-NSQO (2) или после 5 мин преинкубации микросом с указанным реагентом (3). На 10 мин регистрации в систему 2 были добавлены NADH (50 мкМ) (4) или NADPH (50 мкМ) (5). По оси ординат — поглощение света исследуемой системой при 553 нм.

Добавление 2-NSQO в среду, содержащую суспензию микросом, NADPH и цитохром С, вызывало снижение скорости восстановления цитохрома С, которое со временем прогрессировало. Следует отметить, что в зависимости от концентрации реагента наибольшее падение скорости происходило в течение первых 1-5 мин реакции. Преинкубация микросом с 2-NSQO в течение 5 мин с последующим внесением в реакционную среду NADPH и цитохрома С не изменяла скорости восстановления белка.

по сравнению с вышеописанным вариантом. После полного подавления 2-NSQO NADPH-цитохром С-редуктазной активности, добавление в среду инкубации NADH частично возобновляло восстановление цитохрома С. В то время, как повторное добавление NADPH и/или цитохрома С не вызывало повышения скорости реакции ($p > 0.05$). При использовании вместо 2-NSQO его структурного аналога (4-NSQO), а также 2-DQO и DPyO наблюдалась схожая закономерность.

Поскольку клетки K562 не экспрессируют белок p53 (Копнин, 2000), индукция апоптоза в них протекает по независимому от p53 механизму, не исключено, что в нем может принимать участие митохондриальный цитохром С. Поэтому далее нами было изучено влияние стирильных производных хинолина и пиридина на процессы окисления и восстановления цитохрома С в системе *in vitro*, а также изучены возможные условия выхода данного белка из митохондрий в окружающую среду. Результаты показали, что 2-DQO и DPyO в концентрации 5×10^{-7} М не влияли на процесс восстановления цитохрома С. Напротив, процессы окисления указанного белка (рис. 7) протекали со значительной задержкой во времени (разница в скорости окисления цитохрома С проб, содержащих ксенобиотики, по сравнению с пробами без вышеуказанных химических реагентов составляла порядка 15-20 мин). Причем DPyO сильнее тормозил реакции окисления цитохрома С по сравнению с 2-DQO.

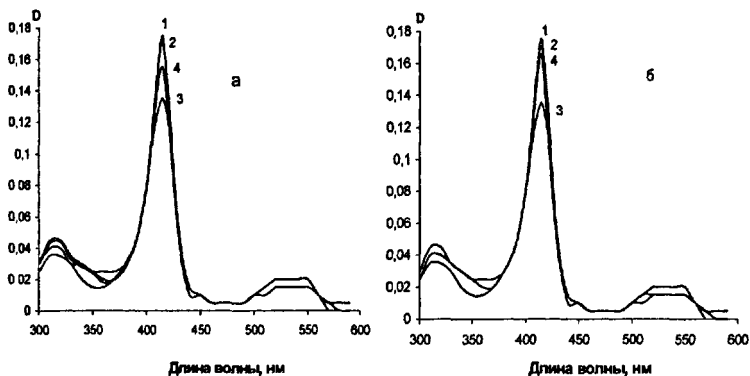


Рис. 7. Влияние 2-DQO (а) и DPyO (б) на процесс окисления цитохрома С.

1 - спектр поглощения восстановленного цитохрома С (концентрация белка в пробе 2.5 мг/мл); 2 - спектр поглощения восстановленного цитохрома С после внесения 5×10^{-7} М 2-DQO (а), DPyO (б); 3 - спектр поглощения окисленного пероксидазой цитохрома С; 4 - спектр поглощения окисленного в присутствии 5×10^{-7} М 2-DQO (а), DPyO (б) цитохрома С.

Нами также показано, что помещение митохондрий из изотонического (0.15 М) в гипотонический (0.015 М) раствор КС1 приводило к набуханию митохондрий, но не способствовало выходу цитохрома С в среду инкубации. При действии гипертонического (1.5 М) раствора КС1 наблюдалось сжатие органелл. Добавление к 0.15 М раствору КС1 1 мМ СаСl₂ (но не MgCl₂) или снижению рН инкубационной среды до 6.6 сопровождалось резким набуханием митохондрий, более четко обозначились максимумы поглощения цитохрома С. Не исключено, что в данных случаях имел место незначительный выход цитохрома С в окружающую среду. Внесение в пробу с СаСl₂ доксициклина (1%) приводило к блокированию набухания органелл.

Таким образом, из представленных результатов следует, что индукция апоптоза в клетках K562 при обработке N-окисидованными производными хинолина и пиридина может осуществляться при участии каспаз 9 и 3, а также митохондриального цитохрома С.

ВЫВОДЫ

1. Среди используемых индукторов дифференцировки наибольшую токсичность по отношению к клеткам K562 проявляют 2-(4-диметиламиностирил)пиридин-1-оксид, 4-нитрохинолин-1-оксид; наименьший токсический эффект имеют цитидин, изобутират, изовалерат натрия и преднизолон. Инкубация с индукторами дифференцировки сопровождается снижением или полным подавлением пролиферации опухолевых клеток. Жизнеспособность клеток в зависимости от используемого индуктора и концентрации варьирует от 60 до 95 %.
2. Индукция эритроидной дифференцировки клеток наблюдается при обработке тимидином, цитидином, гуанозином; бутиратом, изобутиратом, изовалератом натрия; 2-(4-диметиламиностирил)пиридин-1-оксидом, 2-(4-нитростирил)хинолин-1-оксидом и 4-(4-нитростирил)хинолин-1-оксидом. Миелоидная дифференцировка индуцируется при инкубации с дексаметазоном, форбол-12-миристат-13-ацетатом, 4-нитрохинолин-1-оксидом, что сопровождается экспрессией на поверхности маркеров моноцито/макрофагального (CD 14) и мегакариоцитарного (CD41) путей.
3. Наиболее сильный апоптогенный эффект по отношению к клеткам проявляют: гуанозин, бутират натрия, 2-(4-диметиламиностирил)пиридин-1-оксид, 2-(4-нитростирил)хинолин-1-оксид, 4-(4-нитростирил)хинолин-1-

оксид и 4-нитрохинолин-1-оксид. Форбол-12-миристан-13-ацетат, способен блокировать нуклеозид-индуцированный апоптоз. Напротив, дексаметазон и преднизолон способствуют протеканию апоптоза, индуцированного нуклеозидами. В присутствии стирильных производных N-оксидов хинолина и пиридина реализация программы апоптоза в клетках K562 осуществляется при участии митохондриального цитохрома C, каспаз 9 и 3.

4. Инкубация с нуклеозидами или натриевыми солями жирных кислот приводит к значимому увеличению активности каспаз 9 и 3,7,10. При обработке системными кортикостероидами в сочетании с тимидином или бутиратом натрия наблюдается активация каспаз 3, 7, 10, ингибирование эритроидной дифференцировки и апоптоз опухолевых клеток. В то время как инкубация только с кортикостероидами не сопровождается повышением активности указанных каспаз. Форбол-12-миристан-13-ацетат индуцирует в клетках повышение активности каспаз 3 и 6, каспаза 9 в этом варианте обработки, напротив, инактивируется. Аналогичная закономерность имеет место в случае использования комбинаций форбол-12-миристан-13-ацетата с нуклеозидами. Обработка N-оксидированными производными хинолина и пиридина сопровождается резким увеличением активности каспаз 9 и 3, 7, 10 и фрагментацией ДНК.
5. При добавлении к N-оксидированным производным хинолина и пиридина суспензии микросом наблюдаются интенсивные процессы биотрансформации ксенобиотиков. В реакциях катализируемых пероксидазой трансформация реагентов протекает более интенсивно, по сравнению с системой, содержащей микросомальную фракцию. Окисленная форма цитохрома C способствует биотрансформации ксенобиотиков микросомальными монооксигеназами; восстановленная форма белка не влияет или частично замедляет указанные процессы.
6. Стирильные производные N-оксидов хинолина и пиридина способны существенно тормозить реакции окисления, но не восстановления митохондриального цитохрома C, что отражается на функционировании электрон-транспортной цепи митохондрий.
7. Выходу цитохрома C из митохондрий в системе *in vitro* способствуют: помещение органелл в гипотонический раствор хлорида калия, добавление в систему хлорида кальция, снижение pH инкубационной среды.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Волкова Т.О., Малышева У.Е. Модуляция процессов дифференцировки и апоптоза клеток промиелоцитарной линии K562 стирильными производными ряда хинолина и пиридина // Вестник молодых ученых. Серия «Науки о жизни». - 2002. - Вып. 4. - С. 58-63.
2. Волкова Т.О., Малышева У.Е., Немова Н.Н. Сравнительный анализ дифференцирующего и апоптогенного действий цитидина, тимидина и гуанозина на клетки эритромиелозной линии человека K562 // Вопросы мед. химии. - 2002. - Т. 48. - № 6. - С. 586-593.
3. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Зыкина Н.С. Модуляция активности каспаз в клетках K562 в условиях обработки бутиратом, изобутиратом и изовалератом натрия // Вестник молодых ученых. Серия «Науки о жизни». - 2005. - Вып. 1. - С. 72-76.
4. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Форбол-12-миристан-13-ацетат ингибирует апоптоз в эритролейкемических клетках K562, индуцированный рядом нуклеозидов // Онтогенез. - 2005. - Т. 36. - № 1. - С. 18-25.
5. Волкова Т.О., Сак Н.С., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Клеточные механизмы индукции апоптоза в эритромиелозной линии человека K562 при обработке стирильными производными хинолина и пиридина // Биомедицинская химия. - 2005 (в печати).
6. Волкова Т.О., Черномордая Ю.Л., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Модулирующее действие N-окисидированных производных хинолина на индуцированную эритроидную дифференцировку клеток K562 зависит от типа эритроидного индуктора и последовательности обработки опухолевых клеток реагентами // Цитология. - 2001. - Т. 43. - № 9. - С. 86.
7. Малышева И.Е., Волкова Т.О., Немова Н.Н. Клетки крови эритроидного ряда человека: особенности дифференцировки в условиях холодового стресса // Междунар. конференция «Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере». - Сургут. - 2002. - С. 60-62.
8. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Индукция апоптоза в клетках миелоидных опухолевых линий человека. Возможные участники и модуляция их биологической активности // Всероссийская конф. «Проблемы медицинской энзимологии», «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия». - Москва. - 2002. - С. 55.
9. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Участие каспаз в проведении сигнала апоптоза в опухолевых клетках человека // V Междунар. симпозиум «Химия протеолитических ферментов». - Москва. - 2002. - С. 35.
10. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Диметилсульфоксид ингибирует апоптоз в эритролейкемических клетках K562, индуцированный кальциевым ионофором A23187 // Цитология. - 2002. - Т. 44. - № 9. - С. 866-867.
11. Волкова Т.О., Малышева И.Е. Эффекторное влияние индуцированной дифференцировки клеток миелоидных опухолевых линий на модуляцию активности внутриклеточных цистеиновых протеиназ и чувствительность клеток к неспецифическому лизису лейкоцитами человека // Науч. конф. «Карелия и РФФИ». - Петрозаводск. - 2002. - С. 21.

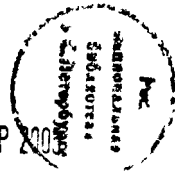
12. Волкова Т.О., Малышева И.Е. Модуляция чувствительности эритролейкемических клеток K562 к неспецифическому лизису лейкоцитами человека в условиях обработки антиопухолевыми агентами // V Конгресс РААКИ «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». - Москва.-2002.-Т. 2.-С. 37.
13. Волкова Т.О., Сак НС, Малышева И.Е., Немова Н.Н. Поиск новых модуляторов электронтранспортной функции белков системы цитохромов в эритролейкемических клетках человека K562 // III Съезд Биохимического общества. - С-Петербург. - 2002. - С. 65-66.
14. Волкова Т.О., Малышева И.Е. Модуляция биологической активности цитохрома *c* в условиях обработки рядом метаболических ингибиторов // 6^{ая} Пушкинская школа-конф. молодых ученых «Биология - наука 21^{го} века». Секция «Молекулярная биология и биохимия». - Пушкино. - 2002. - Т. 1. - С. 229.
15. Волкова Т.О., Сак Н.С., Малышева И.Е. Взаимосвязь цитохромов *c* и P-450 в реакциях метаболизма N-содержащих гетероциклических соединений // 7^{ая} Путинская школа-конф. молодых ученых «Биология - наука 21^{го} века». Серия «Молекулярная биология и биохимия». - Пушкино. - 2003. - С. 39.
16. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Влияние форбол-12-миристан-13-ацетата на модуляцию апоптоза в эритролейкемических клетках человека K562 при обработке рядом химических реагентов // Цитология. - 2003. - Т. 45. - №9. - С. 859.
17. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. Процессы индукции эритроидной дифференцировки и апоптоза клеток K562 в условиях обработки 2-(4-нитростирил)хинолин-1-оксидом и 4-(4-нитростирил)хинолин-1-оксидом // Цитология. - 2003. - Т. 45. - № 9. - С. 859.
18. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Зыкина Н.С., Кожевникова М.Н. Влияние N-оксидированных производных хинолина на активность микросомальных NADPH-оксидоредуктаз и концентрацию никотинамидных коферментов в клетках линии K562 / 8^{ая} Пушкинская школа-конф. молодых ученых «Биология - наука 21^{го} века». Секция «Общая и функциональная биохимия» - Пушкино. - 2004.-С. 72.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 01.02.05. Формат 60x84V₆.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,3. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз. Изд. № 6. Заказ № 473

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел

501

22 MAR 200



1530