



УДК 616-006.441:616.056.552+615.227.3+615.276

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ В КЛІТИНАХ МИШАЧОЇ ЛІМФОМИ NK/Ly ЗА УМОВ ХІМІОТЕРАПІЇ *IN VIVO*

Р. Р. Панчук, Н. М. Бойко, Р. С. Стойка

*Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна*

Метою роботи було дослідити особливості молекулярних механізмів, задіяних у реалізації цитотоксичної дії протипухлинних препаратів вінкристину та доксорубіцину на клітини мишачої лімфоми NK/Ly за умов хіміотерапії *in vivo*. Встановлено, що під впливом доксорубіцину ці лімфомні клітини гинуть через індукцію каспазо-залежного апоптозу. На відміну від доксорубіцину, вінкристин викликав зростання рівня білків с-Мус і Vcl- X_L та утворення гігантських клітин, які з часом гинули внаслідок каспазонезалежного апоптозу за умов підвищених рівнів транскрипційного фактора с-Мус і проапоптичного білка Вах.

Ключові слова: пухлини, мишача лімфома, апоптоз, механізми, хіміотерапія, доксорубіцин, вінкристин.

ВСТУП

Хіміотерапія є одним із основних способів лікування онкологічних хворих, однак розроблені на сьогоднішній день протипухлинні препарати не завжди дають позитивний лікувальний результат. В окремих випадках курс хіміотерапії може погіршувати стан пацієнтів, зокрема, призводити до ендогенної інтоксикації організму. Лімфома NK/Ly вважається перспективною експериментальною моделлю пухлини для дослідження антинеопластичної активності нових протипухлинних препаратів [14]. Нами встановлено, що найбільш ефективним у пригніченні розвитку цієї лімфоми є антрацикліновий антибіотик доксорубіцин, тоді як цитостатик вінкристин виявляв слабший антинеопластичний ефект. Синтетичний стероїд дексаметазон ефективно пригнічував продукцію інтерлейкіну-6, однак при цьому не проявляв вираженої терапевтичної дії [5]. Щоб дослідити молекулярні механізми, якими можна пояснити відмінності у цитотоксичній дії цих протипухлинних препаратів на клітини лімфоми NK/Ly, нами проведено Вестерн-блот аналіз із використанням специфічних антитіл до білків, задіяних в індукції каспазо-залежних і каспазонезалежних механізмів апоптозу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Мишачу лімфому NK/Ly отримали із клітинного банку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ. Пухлину підтримували шляхом доочеревиного перещеплення 0,2–0,3 мл асцитної рідини (20–30 млн клітин) на 7–8-й день росту лімфоми від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта.

Експериментальних тварин утримували відповідно до нормативів законодавства України [2], а також рекомендацій Національного Інституту Здоров'я США.

Інтенсивність росту пухлини контролювали щоденним зважуванням мишей. Кількість живих клітин в асцитній рідині, яку використовували для інокуляції, була не меншою 98%. Забір лімфомних клітин для досліджень проводили на 7–8-й (1-й пасаж), 13–14-й (2-й пасаж) та 20–21-й (3-й пасаж) дні після інокуляції пухлини. Протипухлинні препарати доксорубіцин (Ebeve, Австрія), вінкрисдин (Richter, Німеччина) і дексаметазон („Дарниця”, Україна) було придбано в ліцензованих аптеках. Курс хіміотерапії складався з 10-ти ін'єкцій препарату через день, починаючи з 5-го дня після інокуляції пухлини. При використанні комбінованих схем хіміотерапії (два і більше препаратів) курс іншого препарату зміщували на один день відносно першого, аби звести до мінімуму ризик алергічної реакції тварин і несумісності препаратів.

Для аналізу білків шляхом імуноблотування (Вестерн-блот-аналіз) клітини промивали охолодженим забуференим фізіологічним розчином, після чого додавали лізуючий буфер: 20 мМ Tris/HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5% Тритон X-100, 1% Trasyolol, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF). Лізати білків аналізували, як описано Леммлі [11], електрофорезом за денатуруючих умов у 12% поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенесення білків із ПААГ на нітроцелюлозну мембрану проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Швеція). Мембрану інкубували за присутності специфічних моноклональних кролячих антитіл до фосфорильованих форм білка pRb (Ser 807/811) та pRb (Ser 795), кінази Cdc2 (Tyr 15), каспази-3 та каспази-7 (Cell Signaling, США), транскрипційного фактора c-Myc, проапоптичних білків Bax, Bcl-X_{L/S} (Santa Cruz Biotech, США) та β-актину (Sigma, США) протягом 12 год при 4°C при повільному перемішуванні. Також використовували моноклональні мишачі антитіла до білка p53 (Santa Cruz Biotech, США). На наступному етапі мембрану інкубували із кон'югованими з пероксидазою хрому антитілами до кролячого імуноглобуліну (Amersham Pharmacia Biotech, США). Місця зв'язування кон'югованих із пероксидазою антитіл із досліджуваними білками виявляли за допомогою хемілюмінесценції на рентгенівській плівці (FujiFilm, Японія). Вирівнювання кількості нанесеного білка здійснювали, враховуючи рівень експресії β-актину в тих самих електрофоретичних зразках.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Доксорубіцин (або адриаміцин) належить до групи антрациклінових антибіотиків, які синтезуються мікроорганізмами *Streptomyces peucetius*. Антрацикліни нековалентно зв'язуються з ДНК, пригнічують синтез нуклеїнових кислот та інгібують активність ДНК-топоізомерази II [1]. На даний час цю групу антибіотиків вважають найперспективнішою в онкології. Доксорубіцин має широкий спектр клінічної активності проти солідних і гематологічних пухлин.

Нами показано, що під впливом доксорубіцину відбувається активація каспаз у пухлинних клітинах вже на 13–14-й день після інокуляції лімфоми NK/Ly у мишей (рис. 1). Рівень розщепленої (активної) форми каспази-3 зростає майже на порядок,

а розщепленої (активної) каспази-7 – у 25 разів (рис. 2) порівняно з їхніми рівнями на 1-му пасажі (7–8 днів після інокуляції лімфоми). У кінці курсу хіміотерапії (на 3-му пасажі) нами зафіксовано ще помітніше зростання рівня активних каспаз-3 та -7, що свідчить про зростання інтенсивності апоптичних процесів у клітинах лімфоми NK/Ly. Ці дані також узгоджуються зі суттєвим зниженням рівня антиапоптичного білка Bcl-X_L у клітинах лімфоми NK/Ly під час лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином. У зразках, отриманих від контрольних тварин, вміст цього білка був стабільно високим [4]. Слід зазначити, що виявлені нами зміни в експресії білків у клітинах лімфоми NK/Ly при монотерапії доксорубіцином виявилися подібними, як при застосуванні комбінованої хіміотерапії доксорубіцином і дексаметазоном (рис. 1, 2).

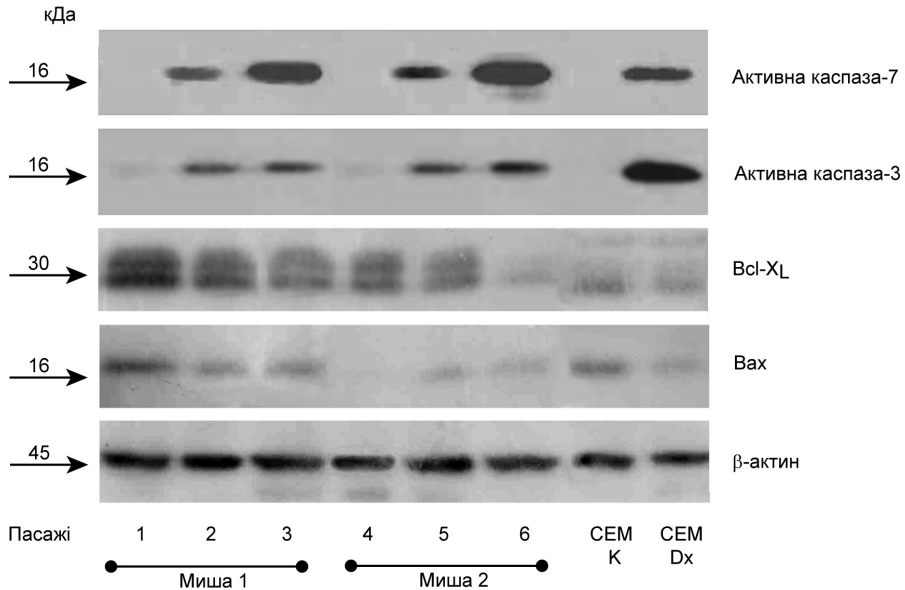


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз білків, задіяних в індукції апоптозу у клітинах лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином і дексаметазоном. На рисунку наведено типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин. 1 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції лімфоми); 2 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини), доксорубіцин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми); 3 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини), доксорубіцин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми); 4 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції пухлини), доксорубіцин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми); 5 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини), доксорубіцин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми); 6 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини), доксорубіцин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми). Стрілками вказано розташування маркерів молекулярної маси білків. CEM K – клітини Т-лейкемії людини лінії CCRF-CEM, позитивний контроль; CEM Dx – клітини лінії CCRF-CEM, після дії доксорубіцину (2 мкг/мл) (негативний контроль)

Fig. 1. Expression of proteins (Western-blot analysis) involved in the induction of apoptosis in murine NK/Ly lymphoma cells after treatment of tumor-bearing animals with doxorubicin and dexamethasone. Immunoblot is a representative of investigation of samples obtained from two of six mice in the experimental group.

1 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);
 2 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);
 3 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);
 4 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation, dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from 6th day after tumor cell inoculation);
 5 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation), dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from 6th day after tumor cell inoculation);
 6 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation), doxorubicin (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation), dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from the 6th day after tumor cell inoculation);
 Arrows indicate the location of protein markers.
 Positive controls: CEM K – CCRF-CEM cells (human T-leukemia cell line); CEM Dx – CCRF-CEM cells, treated with doxorubicin (2 ug/ml)

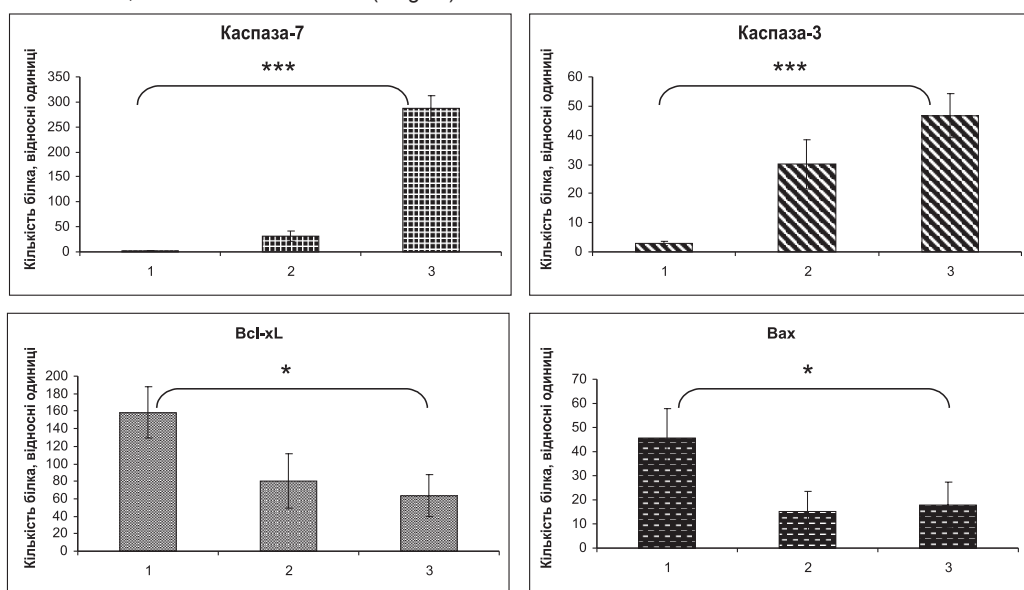


Рис. 2. Денситометрична обробка результатів Вестерн-блот аналізу білків, задіяних в індукції апоптозу у клітинах лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносів доксорубіцином та дексаметазоном. Дані нормалізовано щодо рівня β -актину у тих же клітинах.

1 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції пухлини);
 2 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини);
 3 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини);
 * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Fig. 2. Densitometric processing of Western-blot analysis of proteins involved in apoptosis induction in NK/Ly lymphoma cells after the treatment of tumor-bearing animals with doxorubicin and dexamethasone. Equal protein loading was confirmed by Western blotting for β -actin:

1 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation);
 2 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation);
 3 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation);
 * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Вінкростин – цитостатик, який зв'язується з тубуліновими димерами цитоскелета, що призводить до інгібування збирання мітотичного веретена під час поділу клітини. Дія вінкростину викликає зупинку клітин-мішеней на стадії метафази мітозу. Отже, даний алкалоїд має цитостатичну дію на всі клітини, що активно діляться, включно з клітинами злоякісних новоутворень [1].

Клітини ссавців здатні здійснювати мітоз навіть за дії цитостатиків, але після такого вимушеного поділу їхній розвиток зупиняється у фазі G_1/S [6]. В окремих випадках, за делеції чи втрати функцій гена p53 і надекспресії білка Bcl-X_L у лімфоїдних клітинах, заблокованих у фазі G_1/S , відбувається ендополіплоїдизація, що збільшує шанси цих клітин на виживання [13]. Нами виявлено відсутність експресії білка p53 [4] і високий рівень білка Bcl-X_L (рис. 3, 4) у лімфомних клітинах NK/Ly, що дає змогу припускати ендополіплоїдизацію та ріст цих клітин за умов їхньої зупинки у фазі G_1/S . Як доказ тут можна навести суттєве зростання кількості гігантських клітин (макроцитів) у популяції лімфомних клітин (до 80%), а також надекспресію транскрипційного фактора с-Мус у пухлинних клітинах на термінальній стадії росту лімфоми за умов хіміотерапії з використанням вінкристину. Варто зазначити, що у цьому випадку також не відбувається активації каспаз і зростає рівень білка Вах, що вказує на каспазонезалежний шлях індукції апоптозу вінкристином у клітинах лімфоми NK/Ly (рис. 3, 4).

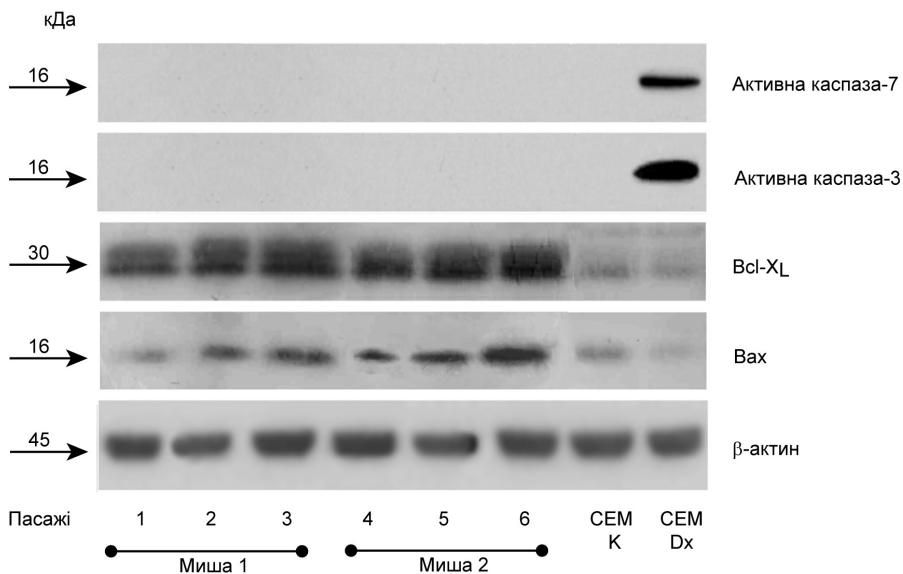


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз білків, задіяних в індукції апоптозу клітин лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв вінкристином і дексаметазоном. На рисунку наведено типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин.

1 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми);
 2 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми);
 3 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми);
 4 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми);
 5 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми);
 6 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини), вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми), дексаметазон (30 мг/м², 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми).

Стрілками вказано розташування маркерів молекулярної маси білків.

СЕМ К – клітини Т-лейкемії людини лінії CCRF-СЕМ, позитивний контроль;

СЕМ Dx – клітини лінії CCRF-СЕМ, після дії доксорубіцину (2 мг/мл) (негативний контроль)

Fig. 3. Expression of proteins (Western-blot analysis) involved in the induction of apoptosis in murine NK/Ly lymphoma cells after the treatment of tumor-bearing animals with vincristine and dexamethasone. Immunoblot is a representative of investigation of samples from two of six mice in the experimental group.

1 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);

2 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);

3 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation);

4 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation), dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from 6th day after tumor cell inoculation);

5 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation), dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from 6th day after tumor cell inoculation);

6 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation), vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation), dexamethasone (30 mg/m², 10 injections every other day, beginning from 6th day after tumor cell inoculation).

Arrows indicate on locations of protein markers.

Positive controls: CEM K – CCRF-CEM cells (human T-leukemia cell line); CEM Dx – CCRF-CEM cells treated with doxorubicin (2 ug/ml)

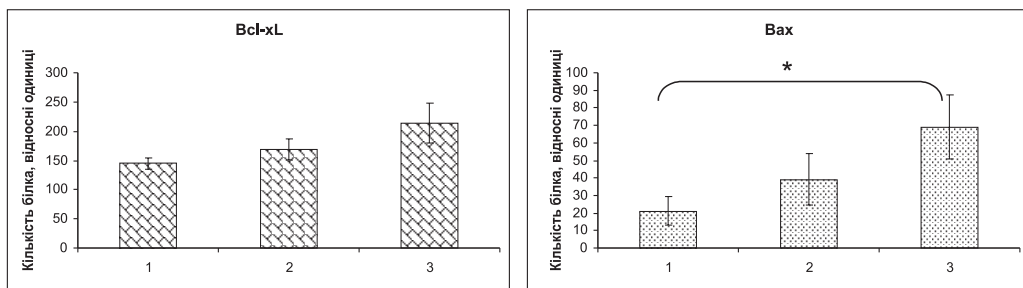


Fig. 4. Денситометрична обробка результатів Вестерн-блот аналізу білків, задіяних в індукції апоптозу клітин лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв вінкристином і дексаметазоном. Дані нормалізовано щодо рівня β-актину у тих же клітинах.

1 – 1-й пасаж (7–8 днів після інокуляції пухлини);

2 – 2-й пасаж (13–14 днів після інокуляції пухлини);

3 – 3-й пасаж (20–21 день після інокуляції пухлини);

* - $p < 0,05$

Fig. 4. Densitometric processing of Western-blot analysis of proteins involved in apoptosis induction in NK/Ly lymphoma cells after the treatment of tumor-bearing animals with vincristine and dexamethasone. Equal protein loading was confirmed by Western blotting for β-actin.

1 – 1st passage (7–8 days after tumor cell inoculation);

2 – 2nd passage (13–14 days after tumor cell inoculation);

3 – 3rd passage (20–21 days after tumor cell inoculation);

* - $p < 0,05$

Відмінність між механізмами цитотоксичної дії доксорубіцину та вінкристину на клітини лімфоми NK/Ly також було підтверджено результатами цитоморфологічних досліджень. Лікування доксорубіцином (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день) призводило до несуттєвого зростання відсотка макроцитів – 12–18% порівняно з контролем, де цей показник становив 5–15%. Клітини лімфоми NK/Ly після дії доксорубіцину характеризуються фрагментацією ядра, конденсацією хроматину, інтенсивним утворенням пухирців на поверхні (блебінг), що вказує на перебіг у цих клітин класичного апоптозу, опосередкованого каспазами. Ці дані також узгоджуються з результатами проведеного нами Вестерн-блот аналізу білків лімфомних клітин [3].

Вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день), на відміну від доксорубіцину, призводив до суттєвого зростання кількості клітин зі збільшеними розмірами (до 80%). Цитоморфологічне дослідження показало принципово інші деструктивні процеси,

які відбуваються у клітинах під дією вінкристину. У таких клітин спостерігаються порушення розходження хромосом і їхня передчасна конденсація, аномальна структура ядра з ділянками гіперконденсованого хроматину й інші зміни (рис. 5). Значно слабше виражені такі морфологічні зміни у лімфомних клітинах, одержаних від контрольних тварин [15]. Це типові ознаки мітотичної катастрофи, що, за деякими характеристиками, подібна до апоптозу [18].

Термін „мітотична катастрофа” (МК) використовують для пояснення механізму відтермінованої мітоз-асоційованої загибелі клітин, зумовленої передчасним або невідповідним вступом клітин у мітотичний поділ. Мітотичну катастрофу можна індукувати сполуками, які впливають на стабільність мікротрубочок цитоскелета, різноманітними протипухлинними препаратами та нездатністю клітин вступати у мітоз внаслідок дефектів у контрольних точках клітинного циклу [17].

Однією із найкраще виражених морфологічних ознак мітотичної катастрофи є утворення гігантських клітин, які мають аномальне ядро [19]. Вважається, що основною причиною цього явища є порушений поділ клітин-мішеней, який супроводжується їх поліплоїдизацією. Особливо часто цей феномен спостерігався у пухлинних клітинах, дефектних по гену білка p53 [7, 10]. Мітотична катастрофа була також

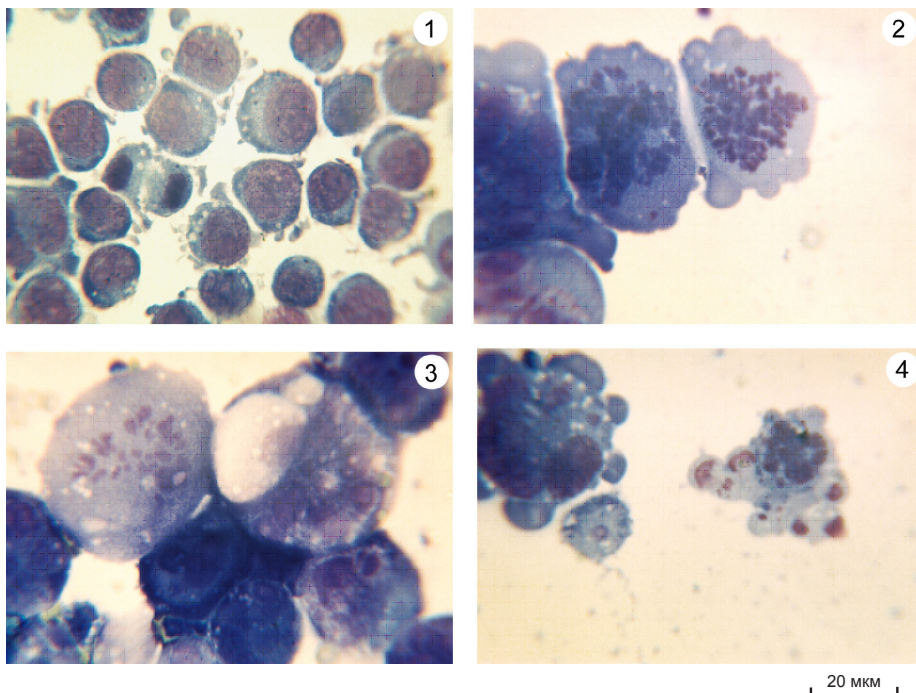


Рис. 5. Морфологія клітин лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв вінкристином: 1 – контроль; 2, 3, 4 – вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день з 5-го дня після інокуляції лімфоми). Порушення локалізації хромосом, фрагментація ядра, вакуолізація цитоплазми. Фарбування азур-еозином за Романовським-Гімза

Fig. 5. Cytomorphological investigation of NK/Ly lymphoma cells after the treatment of tumor-bearing animals with vincristine. 1 – control; 2, 3, 4 – vincristine (1 mg/kg, 10 injections every other day, beginning from 5th day after tumor cell inoculation). Delocalization of chromosomes, nuclear fragmentation, vacuolization of cytoplasm. Azur-eosin staining after Romanovsky-Giemsa

описана як відтермінована форма репродуктивної загибелі клітин, оскільки такі клітини втрачають здатність породжувати життєздатні дочірні клітини. Більшість клітин, які перебувають у такому стані, швидко гинуть, однак у ряді випадків багатоядерні гігантські клітини можуть зберігати тимчасову життєздатність [8,19]. Такі старіючі клітини характеризуються зменшенням їхньої здатності до проліферації, а також набуттям ними сплющеної форми і збільшених розмірів [16, 18].

Остання стадія мітотичної катастрофи майже завжди характеризується утворенням ядерних мембран навколо індивідуальних кластерів дезагрегованих хромосом. Цей стан позитивно корелює із неповним синтезом ДНК і передчасною конденсацією інтерфазних хромосом у вигляді дискретних одиниць у цитоплазмі [9].

В іншій детально описаній формі клітинної загибелі – апоптозі – також спостерігається конденсація хроматину, однак морфологія апоптичних клітин різко відмінна від клітин у стані мітотичної катастрофи й характеризується зменшенням розмірів цитоплазми та фрагментацією ядра. Оскільки при мітотичній катастрофі спостерігають такі типові біохімічні ознаки апоптозу, як пермеабілізація мітохондріальної мембрани й активація прокаспаз, мітотичну катастрофу ще класифікують як особливу форму апоптозу, а не як унікальний вид клітинної загибелі [18]. Проте досі невідомо, які саме механізми – каспазозалежні чи каспазозалежні – призводять до відмирання клітин унаслідок мітотичної катастрофи [12].

Показано, що мітотичну катастрофу можуть індукувати деякі протипухлинні чинники, зокрема, доксорубіцин у низьких концентраціях і вінкрисдин. Клітини, в яких спостерігають мітотичну катастрофу, можуть певний час функціонувати без проліферації, однак у кінцевому випадку вони гинуть за участю p53-опосередкованого або каспазозалежного апоптозу [18]. Додатковими чинниками, які можуть сприяти

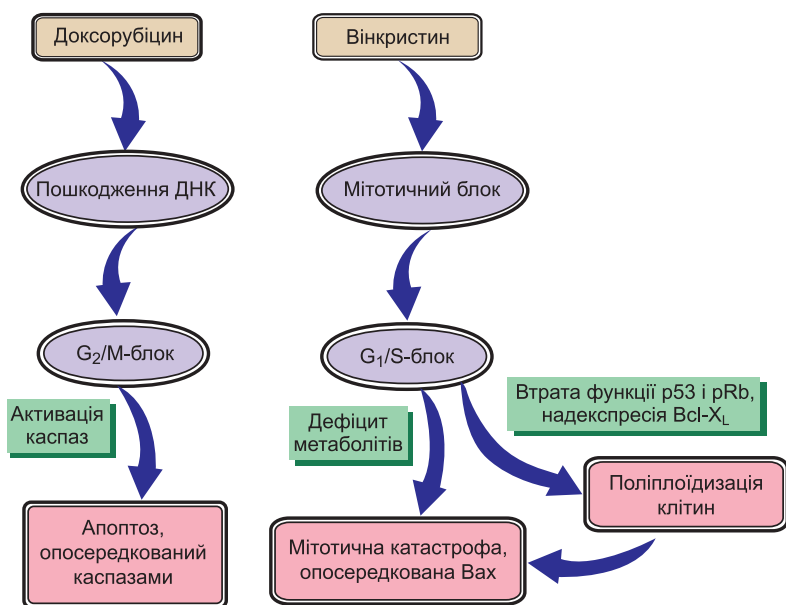


Рис. 6. Схематичне порівняння механізмів проапоптичної дії доксорубіцину і вінкрисдину на клітини мишачої лімфому NK/Ly

Fig. 6. Schematic comparison of the mechanisms of proapoptotic action of doxorubicin and vincristine towards NK/Ly lymphoma cells

вживанню та поліплоїдизації лімфомних клітин, заблокованих антими́тотичними агентами у фазі G₁/S, є відсутність продукту гена p53 та надекспресія антиапоптотичного білка Bcl-X_L у клітинах лімфоми NK/Ly, оброблених вінкристином (рис. 5, 6).

На рис. 6 представлено узагальнену схему механізмів дії вінкристину та доксорубіцину на клітини лімфоми NK/Ly. На підставі отриманих даних ми вважаємо, що причиною загибелі лімфомних клітин під дією вінкристину є мітотична катастрофа, індукована цим агентом. Доксорубіцин переважно діє шляхом індукції у клітинах-мішенях каспазозалежного апоптозу, однак деяке зростання відсотка гігантських клітин (макроцитів), яке спостерігається при дії доксорубіцину, також може бути пояснене тим, що цей агент індукує мітотичну катастрофу у деяких лімфомних клітин.

Подяки: Автори статті щиро вдячні д.б.н. М. Д. Луцику за велику методичну допомогу в роботі з мишачою лімфомою NK/Ly, а також за цінні поради при аналізі одержаних результатів дослідження. Робота була частково підтримана грантом, наданим Р. Панчуку Західно-Українським Біомедичним Дослідницьким Центром (Україна–США).

MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOSIS INDUCTION IN MURINE LYMPHOMA NK/Ly UNDER CHEMOTHERAPY *IN VIVO*

R. R. Panchuk, N. M. Boiko, R. S. Stoika

*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

Peculiarities of the molecular mechanisms that participate in realization of cytotoxic action of anticancer drugs vincristine and doxorubicin towards cells of murine lymphoma NK/Ly during *in vivo* chemotherapy have been defined. It was found that doxorubicin induced caspase-dependent apoptosis of these lymphoma cells. However, vincristine caused an increase in the level of c-Myc and Bcl-XL proteins, as well as formation of giant cells which then were dying via caspase-independent apoptosis appearing at the elevated levels of c-Myc transcription factor and pro-apoptotic Bax protein.

Key words: tumor, murine lymphoma, apoptosis, mechanisms, chemotherapy, doxorubicin, vincristine.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ МЫШИНОЙ ЛИМФОМЫ NK/LY ПРИ УСЛОВИЯХ ХИМИОТЕРАПИИ *IN VIVO*

Р. Р. Панчук, Н. М. Бойко, Р. С. Стойка

*Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина*

Целью работы было исследовать особенности молекулярных механизмов, задействованных в реализации цитотоксического воздействия противоопухолевых препаратов винкристина и доксорубицина на клетки мышинной лимфомы NK/Ly при химиотерапии *in vivo*. Установлено, что под воздействием доксорубицина происходит гибель этих лимфомных клеток из-за индукции каспазозависимого

апоптоза. В отличие от доксорубина, винкристин приводил к увеличению уровня белков с-Мус и Bcl-X_L и образованию гигантских клеток, которые со временем погибали вследствие каспазозависимого апоптоза при повышенном уровне транскрипционного фактора с-мус и проапоптического белка Вах.

Ключевые слова: опухоли, мышьяная лимфома, апоптоз, механизмы, химиотерапия, доксорубин, винкристин.

1. Булкина З. П. **Противоопухолевые препараты** / З. П. Булкина. Киев: Наукова думка, 1991. 302 с.
2. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України. **Відомості Верховної Ради України (ВВР)**, 2006; 27: С. 230.
3. Панчук Р. Р. **Роль цитокінів у молекулярних механізмах ендогенної інтоксикації, викликаній пухлинним ростом та під впливом антинеопластичних препаратів (на моделі мишачої лімфоми NK/Ly)**: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.11 „Цитологія, клітинна біологія, гістологія”. Львів, 2008. 20 с.
4. Панчук Р. Р., Бойко Н. М., Луцик М. Д., Стойка Р. С. Молекулярні процеси залучення інтерлейкіну-6 у процеси розвитку мишачої лімфоми NK/Ly. **Клінічна та експериментальна патологія**, 2008; 7(1): 144–149.
5. Панчук Р. Р., Бойко Н. М., Луцик М. Д., Стойка Р. С. Роль цитокінів у механізмах кахексії, зумовленої пухлинним ростом. **Праці Наукового товариства ім. Шевченка. Хемія і Біохемія**, 2007; XVIII: 209–218.
6. Blajeski A. L., Phan V. A., Kottke T. J., Kaufmann S. H. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **J. Clin. Invest**, 2002; 110(1): 91–99.
7. Castedo M., Perfettini J. L., Roumier T. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, 2004; 23: 2825–2837.
8. Hall L. L., Th'ng J. P., Guo X. W. et al. A brief staurosporine treatment of mitotic cells triggers premature exit from mitosis and polyploid cell formation. **Cancer Res**, 1996; 56: 3551–3559.
9. Ianzini F., Mackey M. A. Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. **Int. J. Radiat. Biol**, 1997; 72: 409–421.
10. Illidge T. M., Cragg M. S., Fringes B. et al. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. **Cell Biol. Int**, 2000; 24: 621–633.
11. Laemmli U. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680–684.
12. Mansilla S., Priebe W., Portugal J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Cell Cycle**, 2006; 5: 53–60.
13. Minn A. J., Boise L. H., Thompson C. B. Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. **Genes. Dev**, 1996; 10(20): 2621–2631.
14. Nemeth L., Kellner B. A new mouse ascites tumor to be used as screening tool. **Neoplasma**, 1961; 8: 337–343.
15. Panchuk R. R., Boiko N. M., Lootsik M. D., Stoika R. S. Tumor ageing in murine lymphoma NK/Ly: cytokine expression and cytomorphological study. **Central European Journal of Biology**, 2007; 2(1): 71–86.
16. Rajaraman R., Guernsey D. L., Rajaraman M. M., Rajaraman S. R. Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer. **Cancer Cell Int**, 2006; 6: P. 25.
17. Roninson I. B., Broude E. V., Chang B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug. Resist. Updat**, 2001; 4: 303–313.
18. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death. Differ**, 2008; 15(7): 1153–1162.
19. Waldman T., Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. **Nature**, 1996; 381: 713–716.

Одержано: 21.11.2008