

УДК 577

П.С.Бабич (5 курс, каф. БФ), В.В.Зенин, к.б.н. (ИНЦ РАН)

## КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТОПОЗИДА (VP16)

Апоптоз – процесс программированной клеточной гибели, возникающий в ответ на некоторые виды внешнего воздействия (тепловой стресс, лишение клетки питательных факторов) или изменения внутреннего статуса клетки (нерепарируемые повреждения ДНК, заражение некоторыми вирусами и т.д.). Процесс апоптоза можно разбить на несколько последовательных стадий, сопровождающихся специфическими биохимическими и морфологическими изменениями.

Факт ингибирования апоптоза в клетках злокачественных новообразований и возможность модуляции апоптотического процесса путем вмешательства в регуляторную сеть клетки стали причиной создания противоопухолевых препаратов, действие которых основано на индуцировании апоптоза.

Данная работа может представлять интерес в медицинском аспекте, так как этопозид является препаратом, широко применяемым в лечении онкологических заболеваний: рака легких, различных лейкозий и лимфом; проведенный анализ фазоспецифичности в дальнейшем может быть использован в специализированных медицинских исследованиях для выработки стратегии лечения пациентов.

Целью представляемого проекта является анализ фазоспецифичности апоптотической гибели, индуцированной у лимфобластоидных линий клеток человека, действием этопозидом при добавлении его в широкий диапазоне концентраций.

В роли апоптотического агента был выбран этопозид (VP16), как современный применяемый в онкологии препарат; в роли клеток-мишеней были использованы суспензионные клетки острой миелоидной лейкемии человека линии U937.

Основной задачей исследования стало изучение динамики изменения воздействия различных концентраций этопозидом на клетки линии U937 и возможных различий в проявлении клеточной гибели.

Для решения поставленной задачи был применен метод проточной цитофлуориметрии, как наиболее адекватный и точный из современных методов выявления и изучения процесса клеточной гибели, и в частности апоптотического процесса.

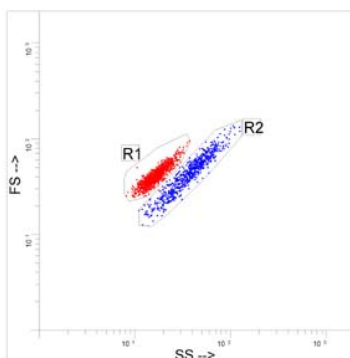


Рис.1. Распределение интактных клеток при двухпараметрическом анализе

В ходе выполнения работы был применен метод выявления апоптотических клеток, разработанный ранее в нашей лаборатории (Boiartchouk, Zenin, CBI, 25, 2,2001) и основанный на изменении величины сигнала прямого светорассеяния (FS). При двухпараметрическом анализе (содержание ДНК / FS) клеток, предобработанных сапонином, наблюдается увеличение сигнала светорассеяния в популяции апоптотических клеток. Данное изменение величины сигнала светорассеяния при мультипараметрическом анализе в потоке позволяет

детектировать апоптоз до появления субG<sub>1</sub>-пика (одного из самых распространенных признаков, выявляемых цитометрически, и связанного с потерей ДНК) и определить фазу клеточного цикла, в которой клетка вступила на путь программируемой гибели.

При двухпараметрическом анализе интактных клеток по светорассеянию – под малыми и большими углами – во всех случаях, включая контроль, выявляются две субпопуляции (зоны R1 и R2, рис.1). По мере увеличения дозы и/или времени действия этопозида происходит перераспределение клеток с увеличением доли клеток в зоне R2.

В таком случае, можно предположить, что в зоне R1 располагаются живые клетки, а в R2 – клетки, которые по принятым представлениям могут быть отнесены к апоптотическим.

Для выяснения этого вопроса был применен метод окрашивания аннексином V и конъюгатом BCECF AM – PI; результаты сравнительного анализа окрашивания позволили сделать вывод, что клетки, относящиеся к зоне R2, являются гибнущими клетками на разных стадиях гибели.

При анализе зависимости доли жизнеспособных клеток от различных концентраций этопозида (0.1 мкМ, 0.2 мкМ, 0.5 мкМ и 1.0 мкМ, воздействие в течение 72 часов) была выявлена обратно пропорциональная зависимость. Расчет доли жизнеспособных клеток производился по результатам анализа светорассеяния и флуорисценции при окраске BCECF AM.

При пермеабиллизации этих клеток сапонином, положение популяции R2 не изменяется, в отличие от популяции, представленной живыми клетками (R1), в которой отмечено значительное уменьшение интенсивности сигналов светорассеяния (FS и SS) и смещение в зону, отличную от R2. Таким образом, нарушения мембраны, вызываемые сапонином, не изменяют значения параметров светорассеяния гибнущих клеток, в то время как у “живых” клеток наблюдаются значительные изменения параметров светорассеяния. Это позволяет различать данные популяции и после пермеабиллизации, необходимой, в частности, для определения содержания ДНК в клетках путем окрашивания интерколирующим красителем (например, пропидием иодидом).

Кроме того при окрашивании пропидием иодидом в данной популяции были обнаружены клетки, имеющие измененную структуру: мембрана данных клеток имеет цитоплазматические протуберанцы (blebbing), что характерно как для онкотических, так и для апоптотических клеток, но при этом ядра сохраняя форму и размеры, характерные для нормальных клеток, имеют слабую окраску PI или вообще не окрашены, что, по-видимому, это связано с высокой степенью фрагментации и частичной экстракцией ДНК из клеток данного типа.

При проведении двухпараметрического цитофлуориметрического анализа было показано, что накопление клеток в S-G<sub>2</sub>/M фазе сопровождалось гибелью клеток из G<sub>1</sub>-S фазы. Изменение распределения клеток, трактуемое как накопление в G<sub>2</sub>/M фазе, может быть следствием не только блокирования дальнейшего прохождения клеточного цикла, но и гибелью клеток из G<sub>1</sub> и S фазы, в результате которой происходит увеличение доли S-G<sub>2</sub>/M клеток в популяции. Полученные данные согласуются с представлениями о фазоспецифичности действия этопозида, но переходу в апоптоз подвержены не только клетки на стадии поздней S-G<sub>2</sub> фазы, но и клетки, находящиеся в G<sub>1</sub>/ранней S фазе.

В ходе выполнения работы

1. Показана возможность разделения нативной популяции клеток линии U-937 на гибнущие и жизнеспособные только по параметрам светорассеяния, результаты измерения которого совпадают с другими методиками аналогичного разделения.
2. Показано, что при пермеабиллизации клеток линии U-937 сохраняются популяции, характеризующиеся как гибнущие и жизнеспособные, что позволяет определять их принадлежность к фазе клеточного роста.
3. Время наступления клеточной гибели находится в обратно пропорциональной зависимости от концентрации этопозида.
4. Действие этопозида низких концентраций вызывает коммитацию к клеточной гибели в G<sub>1</sub>-S фазе клеточного цикла. Данный тип клеточной гибели сопровождается потерей ДНК без уменьшения размеров клеток и фрагментации ядра.