

Активация каспазы-3 при действии амитозина на клетки линии МТ-4 лимфолейкоза человека

А.А. Фильченков¹, М.П. Завелевич¹, Н.Н. Храновская², Л.А. Заика³,
А.И. Потопальский³

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины

²Институт онкологии АМН Украины

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Среди веществ, обладающих противоопухолевой активностью, выявлена большая группа препаратов природного происхождения, а также соединения, полученные на основе их различных химических модификаций. Одними из таких веществ, которые активно изучаются в последнее время, являются алкалоид-этиленимины. Противоопухолевый препарат амитозин был получен в Украине А.И. Потопальским с соавт. на основе модификации алкалоидов чистотела *Chelidonium majus L.* тиофосфамидом [1]. Показан широкий спектр его противоопухолевого действия в отношении различных солидных злокачественных новообразований. Между тем, действие этого препарата на клетки лейкозов и лимфом практически не изучалось, а механизмы, опосредующие противоопухолевую активность амитозина, остаются недостаточно раскрытыми.

Индукция апоптоза и активация каспазного каскада имеют большое значение в реализации цитотоксического действия большинства химиопрепаратов [2]. Между тем вклад этих механизмов в противоопухолевую активность амитозина до настоящего времени практически не исследовался.

Целью настоящего исследования было изучение фазоспецифичности действия амитозина *in vitro* на модели перевиваемой линии клеток острого лимфобластного лейкоза человека МТ-4, а также анализ активации каспазы-3 в процессе апоптоза, инициированного амитозином.

Материалы и методы: Исследования проводили на линии МТ-4 перевиваемых клеток острого лимфобластного лейкоза человека. Препарат

амитозин использовали в концентрации 25-250 мкг/мл. Содержание апоптотических клеток в образцах определяли с помощью светооптической микроскопии (окраска по Май-Грюнвальд-Гимза) и проточной цитофлуориметрии (окраска пропидия йодидом). Для анализа распределения клеток по фазам митотического цикла также использовали проточную цитофлуориметрию. Активную форму каспазы-3 в клетках выявляли, используя набор "mAb Apoptosis Kit FITC" (BD Bioscience Pharmingen, США).

Результаты: Обработка клеток МТ-4 амитозином в концентрациях свыше 100 мкг/мл приводила к существенному торможению их роста, что, однако, не сопровождалось массовой гибелью клеток. Содержание гиподиплоидных (апоптотических) клеток через 24 ч после добавления препарата составляло 24,2% (табл. 1). При этом отмечено выраженное накопление клеток, культивируемых в присутствии амитозина, в точке G₂/М клеточного цикла (рисунок). В аналогичных исследованиях, проведенных с этопозидом (ингибитор ДНК-топоизомеразы II), было показано, что индукция апоптоза сопровождается задержкой прохождения клетками S-фазы (см. табл. 1).

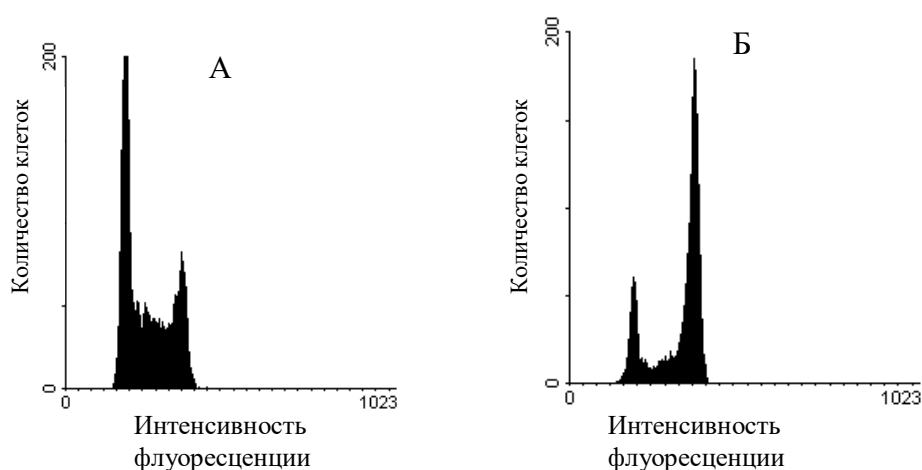


Рисунок. Распределение клеток МТ-4 по фазам цикла при действии амитозина: А – контроль; Б – амитозин, 100 мкг/мл, 24 ч

Табл. 1. Данные проточной цитофлуориметрии клеток МТ-4, окрашенных пропидия иодидом

Препарат	Распределение по фазам клеточного цикла, %			Содержание апоптотических клеток, %
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Амитозин 25 мкг/мл	38,96	46,75	14,25	7,1
Амитозин 100 мкг/мл	13,01	20,03	66,96	24,2
Контроль	41,25	46,26	12,48	5,4
Препарат сравнения этопозид, 40 мкг/мл	79,43	18,12	2,45	54,1

С помощью моноклональных антител С92-605 против активной формы каспазы-3 была показана ее активация через 24 ч после культивирования клеток с различными дозами амитозина при относительно низком значении апоптотического индекса (табл. 2). При этом повышение концентрации амитозина не приводит к существенному увеличению процентного содержания клеток с активированной каспазой-3, даже при почти трехкратном повышении значений АИ (см. табл. 1, 2).

Табл. 2. Содержание активной формы каспазы-3 в клетках МТ-4, обработанных амитозином или этопозидом в течение 24 ч

Препарат, доза мкг/мл	Процент клеток, содержащих активную форму каспазы-3
0	6,67
Амитозин 25	10,93
Амитозин 125	12,84
Амитозин 250	17,71
Этопозид 40	51,20

Выводы: Показано, что амитозин вызывает торможение пролиферации злокачественных лимфоидных клеток человека, индуцируя при этом остановку в точке G₂/M клеточного цикла. Такой механизм действия

амитозина и ряда других широко применяемых противоопухолевых препаратов (например, доксорубицина или винкристина [3, 4]) представляет интерес, поскольку использование амитозина в комбинации с препаратами, действующими на другие фазы клеточного цикла, может приводить к аддитивным или синергическим эффектам. Кроме того, амитозин, который является относительно нетоксическим препаратом, вызывает апоптоз злокачественных лимфоидных клеток человека, сопровождающийся активацией эффекторной каспазы-3.

Литература

1. **Потопальский АИ.** Препараты чистотела в биологии и медицине. Киев, Наукова думка, 1992. 200 сс.
2. **Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW.** Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; **108**: 153-164.
3. **Lee TK, Lau TC, Ng IO.** Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; **49**: 78-86.
4. **Tanaka Y, Fujiwara K, Tanaka H, Maehata K, Kohno I.** Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2004; **14**: 616-620.