

УДК 577.27:591.81
© Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕГО И АПОПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЙ ЦИТИДИНА, ТИМИДИНА И ГУАНОЗИНА НА КЛЕТКИ ЭРИТРОМИЕЛОЛЕЙКОЗНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА K562

Т.О. Волкова, И.Е. Малышева, Н.Н. Немова

Петрозаводский Государственный Университет, 185640,
г. Петрозаводск, пр-т Ленина, 33; тел.: +(8142)-784697; факс: +(8142)-711000;
эл. почта: VolkovaTO@yandex.ru

В работе изучено антипролиферативное, дифференцирующее и апоптогенное действие пиримидиновых (цитидина и тимидина) и пуринового (гуанозина) нуклеозидов по отношению к эритролейкемическим клеткам человека K562. Показано, что 2-х и 4-х суточная обработка клеток 2 мМ р-ром тимидина и 1 мМ р-ром гуанозина сопровождается индукцией эритроидной дифференцировки (синтеза гемоглобина) в опухолевых клетках. Усиление синтеза гемоглобина в клетках, инкубированных с 2 мМ р-ром цитидина, имеет место на 4 сут. При анализе ДНК-деградирующего действия (индукции апоптоза) исследуемых реагентов на клетки K562 с помощью флуоресцентных красителей и модуляции активности каспазы 9 и каспаз 3, 7, 10 в условиях 2-х суточной обработки было обнаружено, что указанная активность индуцируется при инкубации с тимидином и гуанозином (с цитидином подобного эффекта не обнаружено).

Ключевые слова: пролиферация, дифференцировка, апоптоз, каспазы, опухолевые клеточные линии.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что многие цитостатики, используемые в химиотерапии опухолей человека (например, цис-диаминдихлорплатина, адриамицин, 1-β-D-арабинофуранозилцитозин и другие), способны в зависимости от условий обработки индуцировать дифференцировку клеток опухолей *in vivo* и опухолевых линий *in vitro*, в частности, клеток человеческой эритромиелолейкозной линии K562 [1, 2]. Обработка клеток K562 обозначенными химическими реагентами, а также некоторыми другими соединениями приводит к индукции эритроидного пути клеточной дифференцировки, что может быть зарегистрировано по усилению экспрессии эритроидных маркеров - гемоглобина и гликофоринов А и С [3, 4]. Подобный эффект также имеет место при обработке клеток мышинной эритролейкемической линии MEL диметилсульфоксидом, бутиратом натрия или гексаметиленбисацетамидом [5]. Другие соединения (например, форбол-12-миристат-13-ацетат, дексаметазон) способны усилить мегакариоцитарную или моноцито-макрофагальную дифференцировку клеток K562 [6].

Индукторы дифференцировки в зависимости от дозы и условий обработки обладают цитостатическим и (или) цитотоксическим действием на клетки опухолей *in vivo* и опухолевых линий *in vitro*. Указанные выше соединения, а также ряд

ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЕ И АПОПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОЗИДОВ НА КЛЕТКИ K562

других, кроме влияния на дифференцировку способны в определенных условиях индуцировать апоптоз опухолевых клеток [7, 8]. В настоящее время известно большое количество морфологических и биохимических маркеров апоптоза. Среди них - изменение активности многих клеточных ферментов, в частности, каспаз (ICE-подобные протеазы - от interleukin-1- β -converting enzyme), кальпаинов, эндонуклеаз, олигонуклеосомная фрагментация ядерной ДНК и полная разборка всех клеточных компонентов. Поскольку индуцированная *in vitro* дифференцировка клеток опухолевых линий тесно связана с подавлением пролиферации, а во многих экспериментальных системах с гибелью клеток по типу апоптоза, очевидно, что индукция дифференцировки и (или) апоптоза опухолевых клеток *in vivo* представляет собой перспективный подход к терапии рака [9].

Ранее нами было показано, что обработка клеток K562 тимидином индуцирует эритроидную дифференцировку опухолевых клеток, приводит к возникновению в ДНК 1- и 2-нитевых разрывов с последующим запуском процессов апоптоза [10, 11]. В настоящей работе была изучена способность двух других нуклеозидов (цитидина и гуанозина) в зависимости от условий обработки индуцировать эритроидную дифференцировку и апоптоз опухолевых клеток K562.

МЕТОДИКА. Клетки человеческой эритролейкемической линии K562 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали в полной среде: 89 % RPMI 1640 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва), содержащей 11 % эмбриональной телячьей сыворотки (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва), 2 mM L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина сульфата, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола ("Ferak", Германия). Культуры засевали в 1 мл (3 мл) среды при начальной плотности 10^5 (10^6) клеток/лунку соответственно. В среду вносили цитидин, тимидин, гуанозин ("Reanal", Венгрия) в концентрациях, указанных в тексте и в подписях к рисункам. Численность клеток определяли с помощью камеры Горяева, жизнеспособность оценивали по тесту с трипановым синим.

Определение внутриклеточной концентрации гемоглобина проводили с помощью бензидиновой пробы [12]. Клетки снимали с лунок микропланшет раствором Хенкса, подсчитывали в камере Горяева, дважды отмывали фосфатным буфером. К 70 тыс. клеток K562 добавляли 100 мкл 0,3 % раствора бензидинового реактива и 100 мкл 0,3 % раствора перекиси водорода. Пробы фотометрировали через 30 мин на КФК-3 при $\lambda=535$ нм. Внутриклеточную концентрацию гемоглобина ([Hb]_i) определяли по калибровочной кривой, построенной на основании величин оптической плотности, полученных при фотометрировании растворов с точно известным содержанием гемоглобина. Для построения калибровочной кривой использовали гемоглобин лошади ("Reanal", Венгрия). Далее [Hb]_i пересчитывали на 10^5 клеток.

Определение характера повреждений ДНК (1- и 2-нитевые разрывы) проводили по изменению параметров флуоресценции двух ДНК-тропных красителей: бромистого этидия (БЭ) ("Sigma", США) и 4', 6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ) ("Serva", США) [13, 14]. Клетки K562 предварительно синхронизировали инкубацией с 1 mM р-ром тимидина в течение 24 часов, затем инкубировали с исследуемыми реагентами. Далее аликвоты клеток (0,02 млн клеток K562) снимали с лунок микропланшет, однократно отмывали 0,15 M NaCl. Для получения ДНК в нуклеоидном виде [15] к полученным пробам добавляли по 20 мкл холодной лизирующей смеси (буфер А: 0,01 M трис-HCl, 0,1 M ЭДТА, 2 M NaCl, 0,5 % тритон-X100, pH 8,0) и после перемешивания встряхиванием инкубировали на холоде (2-4°C) в течение 15 мин. Затем лизаты переносили в буфер Б (0,01 M трис-HCl, 0,1 M NaCl, 0,01 M ЭДТА, pH 7,4) в кювету для измерения флуоресценции. Измерения проводили на приборе ФМ-Ц-2. В кювету с опытной пробой последовательно вносили ДАФИ (конечная концентрация - 0,1 мкг/мл; параметры интерференционных светофильтров: λ возбуждения - 357 нм, λ эмиссии - 444 нм) и БЭ (конечная концентрация - 4 мкг/мл; параметры

интерференционных светофильтров: λ возбуждения - 514 нм, λ эмиссии - 606 нм). Полосы пропускания для ДАФИ - 39 нм на возбуждение и 15 нм на эмиссию; для БЭ - 26 нм на возбуждение и 12 нм на эмиссию. После внесения каждого компонента измеряли флуоресценцию при соответствующих длинах волн возбуждения и эмиссии. Перед внесением красителей определяли фоновую интенсивность флуоресценции при указанных длинах волн. Параллельно определяли аналогичные параметры в пробах, не содержащих лизатов клеток. Находили $\Delta БЭ$ и $\Delta ДАФИ$, характеризующие изменение флуоресценции красителей при связывании с ДНК по формуле: $\Delta БЭ (\Delta ДАФИ) = I_1 - I_2 - (I_3 - I_4)$, где I_1 - интенсивность флуоресценции пробы, содержащей клеточный лизат и БЭ (ДАФИ) в буфере Б; I_2 - интенсивность флуоресценции клеточного лизата в буфере Б; I_3 - интенсивность флуоресценции БЭ (ДАФИ) в буфере Б; I_4 - интенсивность флуоресценции буфера Б. В качестве стандартной ДНК использовали ДНК из эритроцитов цыплят ("Reanal", Венгрия), пропущенную 20 раз через иглу с внутренним диаметром 0,3 мм в 0,01 М трис-НСl-ЭДТА-буфере, pH 7,4.

Определение активности каспаз проводили стандартным методом согласно прилагаемой инструкции с использованием специфических субстратов, меченных флуоресцентной меткой (7-амино-4-трифлуорометилкумарин - AFC) ("BioRad", США), детектируемой по изменению флуоресценции или оптической плотности. Клетки K562 (10^6 клеток) снимали с лунок микропланшет, дважды отмывали фосфатным буфером, добавляли к клеткам 50 мкл лизирующего буфера, приготовленного смешиванием 920 мкл $H_2O_{дист.}$, 40 мкл 25х реакционного буфера и 10 мкл каждого из четырех ингибиторов: PMSF (35 мг/мл), пепстатина А (1 мг/мл), апротинина (1 мг/мл) и лейпептина (1 мг/мл). 25х реакционный буфер включал следующие компоненты: 250 мМ HEPES, pH 7,4, 50 мМ ЭДТА, 2,5 % CHAPS (3-((3-хлорамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат), 125 мМ дитиотреитол. Далее клетки трижды замораживали в жидком азоте, затем клеточный лизат центрифугировали на микроцентрифуге при 17 000 g ($4^\circ C$) в течение 30 мин, собирали супернатант (образец). Определение активности каспаз 3, 7, 10 и 9 проводили в реакционном буфере путем смешивания образца и соответствующего специфического субстрата или ингибитора. Субстрат для каспаз 3, 7, 10 - DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), для каспазы 9 - LETD (Leu-Glu-Thr-Asp). Определение количества отщепленного AFC проводили на CF-46 при $\lambda=395$ нм через 30, 60, 90, 120, 150, 180 мин после начала реакции. Далее строили график, демонстрирующий изменение активности каспаз в зависимости от времени инкубации образца и соответствующего субстрата.

В работе использовали тритон X-100 ("Ferak", Германия), трис ("Реанал"), трипановый синий ("Sigma"), остальные реактивы отечественного производства квалификации "хч". Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Обработка клеток K562 возрастающими концентрациями нуклеозидов (1-3 мМ цитидина, 1-3 мМ тимидина и 1-3 мМ гуанозина) в течение 1-4 сут. инкубации приводила к дозо- и время-зависимому снижению темпа пролиферации опухолевых клеток. На рис.1 представлена динамика роста численности клеток, обработанных 2 мМ р-ром цитидина, 2 мМ р-ром тимидина и 2 мМ р-ром гуанозина в течение вышеуказанного промежутка времени. Из представленных результатов следует, что два из трех изученных нуклеозидов (тимидин и гуанозин) полностью блокировали пролиферацию опухолевых клеток, начиная с 1 сут. после внесения индукторов в среду культивирования. Кривая роста численности клеток K562, обработанных 2 мМ р-ром цитидина, выходила на плато только на 3 сут. инкубации с реагентом, численность опухолевых клеток при этом достигала $358,24 \pm 0,87$ тыс. клеток на лунку, и в течение последующих суток не изменялась. В то же время численность контрольных клеток продолжала экспоненциально возрастать и к 4-м сут. становилась $720,00 \pm 0,95$ тыс. клеток на лунку. Следует отметить, что динамика роста численности клеток, обработанных 1 мМ и 3 мМ р-рами нуклеозидов,

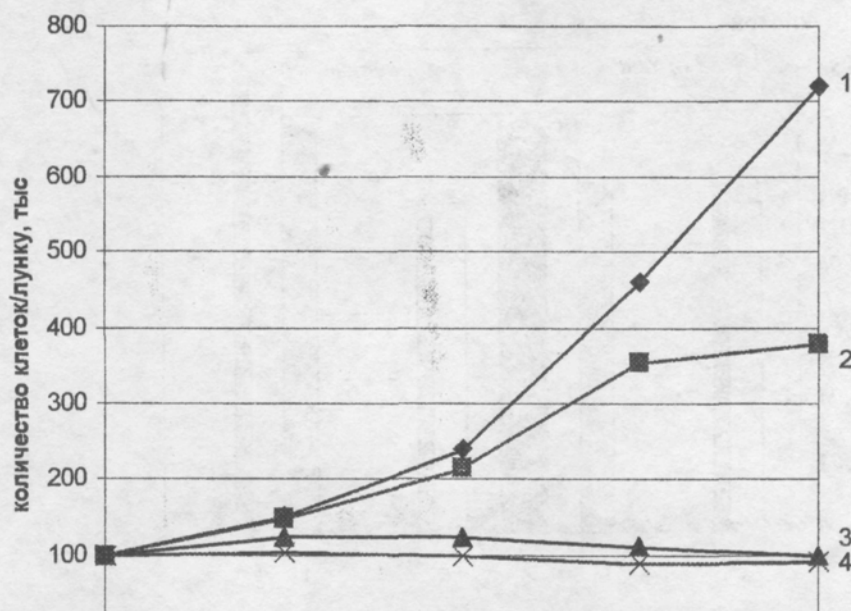


Рисунок 1.

Динамика роста клеток K562, необработанных индукторами дифференцировки и растущих в присутствии цитидина, тимидина и гуанозина. 1 - необработанные клетки K562 (контроль); 2 - клетки, инкубированные с 2 мМ р-ром цитидина; 3 - с 2 мМ р-ром тимидина; 4 - с 2 мМ р-ром гуанозина. Исходная плотность посева - 10^5 клеток на лунку.

прослеживала аналогичную направленность (данные не представлены). Определение жизнеспособности при 2-х суточной инкубации клеток с нуклеозидами показало, что данный параметр достоверно отличался от контроля ($97,90 \pm 0,31$) только для 3 мМ р-ра тимидина, 2 и 3 мМ р-ров гуанозина: $89,73 \pm 1,91$; $79,65 \pm 1,87$ и $67,98 \pm 0,92$ соответственно. В течение последующих суток инкубации с указанными концентрациями индукторов жизнеспособность клеток продолжала снижаться.

На рис.2 представлены результаты определения концентрации гемоглобина как одного из маркеров эритроидной дифференцировки в клетках K562. Концентрации цитидина, тимидина и гуанозина, указанные на рис.2, были определены в предыдущей серии экспериментов. Критерием для этого послужила минимальная токсичность реагентов (по тесту с трипановым синим жизнеспособность клеток во всех вариантах значимо не отличалась от контроля) наряду с достоверным усилением синтеза гемоглобина и подавлением клеточной пролиферации. Из представленных результатов следует, что в зависимости от времени инкубации все три используемых индуктора приводили к различному по величине, но достоверному увеличению внутриклеточной концентрации гемоглобина (в случае тимидина и гуанозина данный эффект имел место на 2 сут. инкубации клеток с реагентами, в случае цитидина значимое усиление синтеза гемоглобина отмечалось к 4-м сут.). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция дифференцировки клеток тесно связана с подавлением их пролиферации, и, как правило, эти процессы несколько разделены во времени.

Обработка клеток индукторами дифференцировки в зависимости от используемой дозы соединения может сопровождаться гибелью по типу апоптоза или некроза, обусловленной токсическим действием химического соединения. С другой стороны, обработка клеток химическими дифференцирующими агентами в низких (нетоксичных или малотоксичных) концентрациях, может также привести (вследствие индуцированной дифференцировки) к запуску процессов апоптоза. В

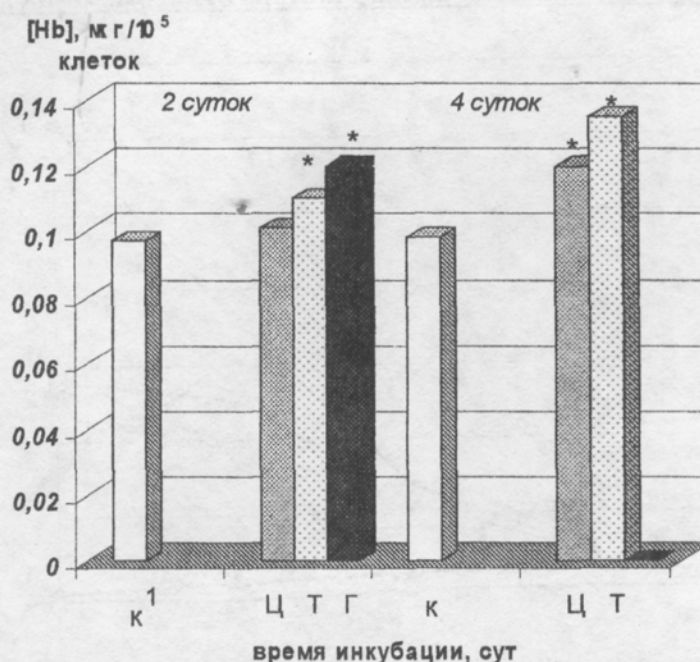


Рисунок 2.

Концентрация гемоглобина в клетках K562, обработанных цитидином, тимидином и гуанозином в течение 2-х и 4-х суток инкубации. К - необработанные клетки K562 (контроль); Ц - клетки, инкубированные с 2 мМ р-ром цитидина; Т - с 2 мМ р-ром тимидина; Г - с 1 мМ р-ром гуанозина. На 4-е сут инкубации концентрация гемоглобина в опухолевых клетках, обработанных гуанозином, не определялась вследствие низкой жизнеспособности клеток. * - достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0,05$).

связи с этим, далее нами была изучена индукция деградации ДНК и запуск апоптоза в клетках K562 в условиях, приводящих к эритроидной дифференцировке клеток. На рис. 3 и 4 представлены данные по изменению активности каспазы 9 и каспаз 3, 7, 10 соответственно в клетках K562, обработанных 2 мМ р-ром цитидина, 2 мМ р-ром тимидина и 1 мМ р-ром гуанозина в течение 2 сут. Из представленных результатов следует, что инкубация опухолевых клеток в присутствии тимидина и гуанозина приводила к значимому увеличению активности ферментов индукции апоптоза во всех исследуемых вариантах, тогда как при обработке клеток цитидином на 2 сут. инкубации подобного эффекта не обнаружено. Следует отметить, что незначительная активация каспазы 9 в клетках K562, инкубированных с цитидином, имеет место на 4 сут., что также коррелирует с индукцией в них эритроидной дифференцировки (данные не представлены). Результаты по увеличению активности каспаз коррелируют с данными по усилению флуоресценции БЭ и ДАФИ при связывании с ДНК клеток, обработанных нуклеозидами (табл.). Двухсуточная инкубация клеток с 2 мМ р-ром тимидина или 1 мМ р-ром гуанозина (но не 2 мМ р-ром цитидина) приводила к достоверному усилению флуоресценции обоих ДНК-тропных красителей.

Из представленных результатов следует, что эритроидная дифференцировка клеток K562, индуцированная цитидином, тимидином и гуанозином, сопровождается подавлением пролиферации опухолевых клеток и запуском запрограммированной клеточной гибели. Известно, что в опухолях *in vivo* и опухолевых клетках *in vitro* возникает прогрессирующий дисбаланс между ферментами синтеза и распада, а также между суммарными активностями анаболических и катаболических путей [16]. В результате, например,

ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЕ И АПОПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОЗИДОВ НА КЛЕТКИ K562

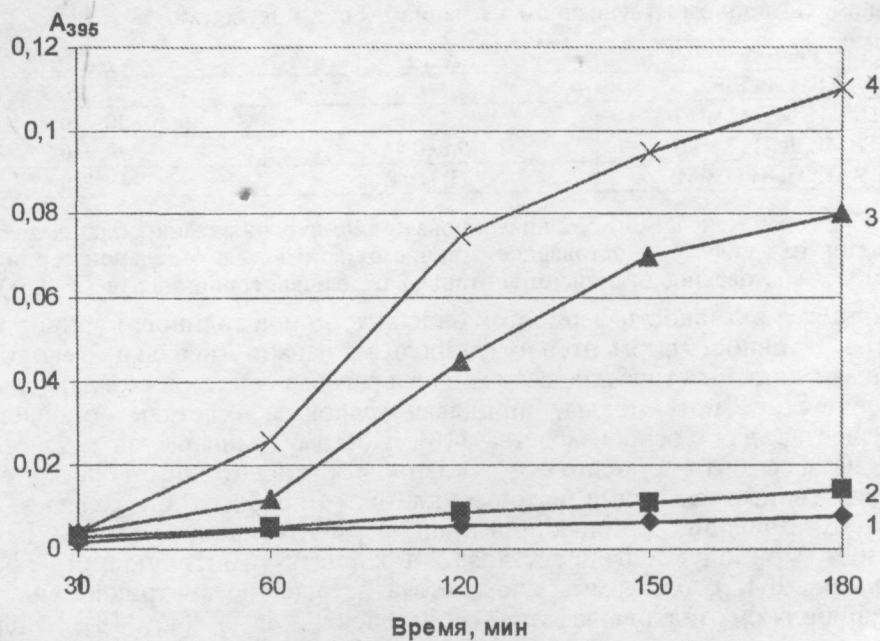


Рисунок 3.

Изменение активности каспазы 9 в клетках K562, обработанных цитидином, тимидином и гуанозином в течение 2-х суток инкубации. По оси ординат: изменение поглощения отщепленного AFC, определенное на СФ-46 при $\lambda=395$ нм. 1 - базовый уровень каспазы 9 для нестимулированных клеток (контроль); 2 - активность каспазы 9 в клетках, обработанных 2 мМ р-ром цитидина; 3 - активность каспазы 9 в клетках, обработанных 2 мМ тимидина; 4 - активность каспазы 9 в клетках, обработанных 1 мМ р-ром гуанозина.

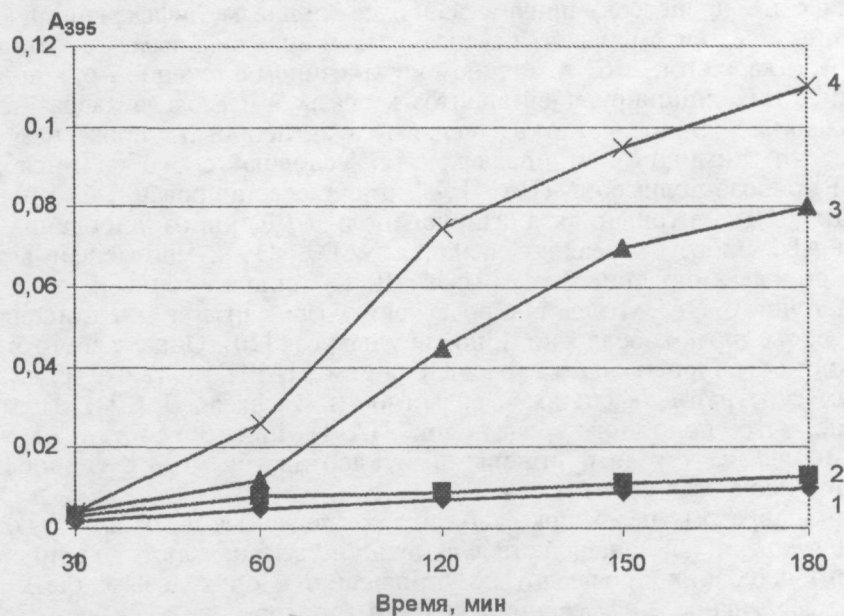


Рисунок 4.

Изменение активности каспаз 3, 7, 10 в клетках K562, обработанных цитидином, тимидином и гуанозином в течение 2-х суток инкубации. По оси ординат: изменение поглощения отщепленного AFC, определенное на СФ-46 при $\lambda=395$ нм. 1 - базовый уровень каспаз 3, 7, 10 для нестимулированных клеток (контроль); 2 - активность каспаз 3, 7, 10 в клетках, обработанных 2 мМ р-ром цитидина; 3 - активность каспаз 3, 7, 10 в клетках, обработанных 2 мМ р-ром тимидина; 4 - активность каспаз 3, 7, 10 в клетках, обработанных 1 мМ р-ром гуанозина.

Таблица. Параметры ΔБЭ и ΔДАФИ нуклеотидов клеток K562, обработанных цитидином, тимидином и гуанозином в течение 2-х сут. инкубации.

Реагент	ΔБЭ	ΔДАФИ
КОНТРОЛЬ	3,3±0,5	27,6±0,7
ЦИТИДИН (2 мМ)	5,1±0,9	30,7±0,9
ТИМИДИН (2 мМ)	9,8±0,4*	34,9±0,7*
ГУАНОЗИН (1 мМ)	11,7±0,8*	49,1±0,6**

Примечание: Клетки K562 инкубировали в 96-луночных микропланшетах по 0,02 млн. клеток на лунку. * - достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0,05$) ** - достоверное отличие от контроля в отдельной серии опытов ($p < 0,01$).

увеличивается активность ферментов биосинтеза пиримидинов, пуринов и ДНК; напротив, активность ферментов их катаболизма падает. Дисбаланс в метаболизме увеличивает биосинтетические возможности раковых клеток и резко подавляет их катаболические потенциалы, придавая раковым клеткам определенные преимущества для воспроизводства [16]. Поэтому направленное действие на ключевые ферменты биосинтеза нуклеиновых кислот может резко снизить пролиферативные потенции раковых клеток. Обработка опухолевых клеток тимидином приводит к ингибированию ферментативной системы с общим названием рибонуклеотидредуктаза (скорость-лимитирующий фермент метаболизма ДНК), тем самым способствуя истощению внутриклеточного пула дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (в частности, dCTP [17, 18]). Подобный процесс лежит в основе одной из форм генотоксического стресса. В результате биосинтез предшественников ДНК становится невозможным, блокируется клеточная пролиферация. Не исключено, что подобный эффект также лежит в основе механизма действия на клетки других пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов (в частности цитидина и гуанозина). Нами показано, что остановка пролиферации клеток K562, обработанных нуклеотидами, тесно связана с индукцией в них эритроидной дифференцировки и последующим запуском апоптотических процессов, причем наиболее сильным дифференцирующим и апоптогенным реагентом является гуанозин, наименее сильным - цитидин (рис. 2, 3, 4). Обработка клеток K562 тимидином и гуанозином в течение 2 сут. приводит к активации в них инициирующей апоптоз каспазы 9 и каскада каспаз 3, 7, 10. Зрелая каспаза 9 также может расщеплять и активировать прокаспазу 3 [20]. Известно, что тимидин при определенных условиях способен ингибировать поли(ADP)-рибозо-полимеразу (ПАРП) - фермент, ассоциированный с процессами репарации ДНК, который катализирует поли(ADP)-рибозилирование белков (донором ADP-рибозы в реакции является NAD^+ [19]). Чрезмерная активация ПАРП при массивных разрывах ДНК, сильно снижая содержание внутриклеточного NAD^+ , ведет к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания, провоцируя гибель клетки по типу некроза [20]. Однако апоптотическая гибель клетки сопровождается расщеплением ПАРП, а также ряда других клеточных субстратов, каспазами (в частности, каспазой 3 [21]). Поэтому не исключено, что подобного рода блок ПАРП при обработке клеток как пиримидиновыми, так и пуриновыми нуклеотидами может способствовать протеканию процессов апоптоза.

Таким образом, нами показано, что исследуемые в работе нуклеотиды (тимидин, гуанозин и в меньшей степени цитидин) в зависимости от концентрации и времени инкубации проявляют по отношению к опухолевым клеткам K562 антипролиферативное, дифференцирующее и апоптогенное действие. Подобные эффекты в клетках могут быть реализованы на уровне ключевых ферментов синтеза и распада нуклеиновых кислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 02-04-49999, № 02-04-06427).

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Parodi M.T., Tonini G.P., Bologna R., et al.* (1988). *Boll. Ist. Sieroter. Milan*, **67**, 142-148.
2. *Jeannesson P., Lahlil R., Chenais B., et al.* (1997). *Leuk. Lymphoma*, **26**, 575-587.
3. *Gahmberg C.G., Jokinen M., Andersson L.C.* (1979). *Ibid*, **254**, 7442-7448.
4. *Okabe-Kado J., Hayashi M., Honma Y., et al.* (1986). *Cancer Res.*, **46**, 1239-1243.
5. *Chang T.J., Scher B.M., Waxman S., et al.* (1993). *Mol. Endocrinol.*, **7**, 528-542.
6. *Butler T.M., Ziemiecki A., Friis R.R.* (1990). *Cancer Res.*, **50**, 6323-6329.
7. *Solary E., Bertrand R., Pommier Y.* (1994). *Leukemia*, **8**, 792-797.
8. *Garcia-Bermejo L., Vilaboa N.E., Perez C., et al.* (1997). *Exp. Cell Res.*, **236**, 268-274.
9. *Polyi I.* (1988). *Pathol. Res. Pract.*, **184**, 11-17.
10. *Анисимов А.Г., Болотников И.А., Волкова Т.О.* (1999). *Бюл. эксп. биол. и мед.*, **128**, № 11, 521-524.
11. *Анисимов А.Г., Чекмасова А.А., Волкова Т.О., Немова Н.Н.* (2001). *Цитология*, **43**, № 1, 76-81.
12. *Andersson L.C., Nilsson K., Gahmberg C.G.* (1979). *Int. J. Cancer*, **23**, 143-147.
13. *Иванов С.Д.* (1992). Автореф. дис. д-ра биол наук, С.-Петербург, 40 с.
14. *Анисимов А.Г., Болотников И.А.* (1999). *Цитология*, **41**, № 8, 680-684.
15. *Cook P.R., Brasell I.A.* (1978). *Eur. J. Biochem.*, **84**, 465-477.
16. *Вебер Дж.* (2001). *Биохимия*, **66**, 1438-1449.
17. *Reynolds E.C., Harris A.W., Finch L.R.* (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 110-123.
18. *Matsui T., Watanabe Y., Taketo A.* (1999). *Anticancer Res.*, **19**, 4B, 3037-3044.
19. *Purnell M.R., Whish W.J.D.* (1980). *Biochem. J.*, **185**, № 3, 775-777.
20. *Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М.* (2000). *Биохимия*, **65**, 1029-1046.
21. *Куцый М.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И.* (1999). *Биохимия*, **64**, 149-163.

Поступила 09.05.2002.

COMPARATIVE ANALYSIS DIFFERENTIATING AND APOPTOGENIC EFFECTS OF CYTIDINE, THYMIDINE AND GUANOSINE ON HUMAN ERYTHROLEUKAEMIC K562 CELLS

T.O. Volkova, I. E. Malysheva, N.N. Nemova

Petrozavodsk State University, prosp. Lenina, 33, Petrozavodsk, 185640, Russia;
tel.: +(8142)-784697, fax: +(8142)-711000; e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

The antiproliferative, differentiating and apoptogenic effects of purinic (cytidine and thymidine) and pyrimidinic (guanosine) nucleosides on K562 cells were investigated. Induction of erythroid differentiation (haemoglobin synthesis) in cancer cells was observed after 2 and 4 days incubation with 2 mM thymidine and 1 mM guanosine. Increase of haemoglobin synthesis in K 562 cells incubated with 2 mM cytidine was detected at 4 day. Analysis of the DNA-degrading effect (induction of apoptosis) of the reagents used on K 562 cells by fluorescent dyes and modulation activity of caspase 9 and also caspases 3,7,10 is induced with thymidine and guanosine but not with cytidine.

Key words: proliferative, differentiation, apoptosis, caspases, cancer cell lines.