

УДК 577.27:591.81  
©Коллектив авторов

## КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В ЭРИТРОМИЕЛОЛЕЙКОЗНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА K562 ПРИ ОБРАБОТКЕ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИНОЛИН-N-ОКСИДА

*Т.О. Волкова, Н.С. Зыкина, И.Е. Малышева, Н.Н. Немова*

Кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии  
Петрозаводского государственного университета, 185640, г. Петрозаводск,  
пр-т Ленина, 33; тел.: +(8142)-784697; факс: +(8142)-711000;  
эл. почта: VolkovaTO@yandex.ru

Изучено влияние двух N-оксидированных производных хинолина (2-(4'-нитростирил)-хинолин-1-оксида – 2-NSQO, 4-(4'-нитростирил)-хинолин-1-оксида – 4-NSQO) на модуляцию активности микросомальных NADPH-оксидоредуктаз, концентрацию никотинамидных коферментов и индукцию апоптоза в эритролейкемических клетках человека K562. Показано, что 4-NSQO в концентрации 10 мкМ ингибировал NADPH-цитохром c-редуктазную активность микросом опухолевых клеток на 15%, а 10 мкМ 2-NSQO – на 50%. При обработке клеток указанными реагентами на 2 сут. инкубации имели место активация каспаз-9 и -3, усиление флуоресценции этидий бромида и 4',6-диамидино-2-фенилиндола при связывании с ДНК и запуск апоптоза. Индукции апоптоза предшествовало снижение внутриклеточной концентрации никотинамидных коферментов. Полученные результаты позволяют рассматривать 4-NSQO (и его структурных аналогов) как перспективное соединение для дальнейших экспериментальных исследований в качестве антиопухолевого агента со сниженным токсическим действием на ткани организма.

**Ключевые слова:** миелоидные опухолевые линии, апоптоз, каспазы, NADPH-зависимые редуктазы, N-оксидированные производные хинолина

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что многие цитостатические агенты, используемые в химиотерапии опухолей человека, такие как 1-β-D-арабинофуранозилцитозин, адриамицин, метотрексат в зависимости от условий способны индуцировать апоптоз клеток опухолей *in vivo* и опухолевых линий *in vitro*, в частности, клеток человеческой эритромиелолейкозной линии K562 [1-3]. Молекулярные и клеточные механизмы протекания апоптоза в разных клетках различны; они зависят от типа индуктора, гистогенетического происхождения опухолевых клеток и условий их обработки. Одними из основных маркеров процесса являются внутриклеточная активация каспаз (*cysteinyll aspartate-specific proteinases*), модуляция активности белков семейства Bcl-2, олигонуклеосомная фрагментация ДНК и другие [4]. Среди большого спектра реагентов, применяемых в онкологической практике и обладающих вышеназванной биологической активностью, особую группу составляют производные N-содержащих гетероциклических соединений, например, пурина, пиримидина, хинолина, антрациклина. Данная группа химических реагентов, как правило, является

высококонкурентными структурными аналогами ключевых молекул клетки (азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, различных коферментов и т.д.) и действует, активируя или ингибируя определенный клеточный процесс.

Производные N-содержащих гетероциклов высокоэффективны для лечения опухолей различной локализации и гистогенеза. Однако широкое применение многих из них ограничивается высокой токсичностью, которая обычно проявляется в виде тошноты, рвоты, нарушения функции печени, почек, гемо-, ото- и нейротоксичности [5]. Поэтому поиск соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью и низкими побочными эффектами представляет несомненный интерес.

Основной механизм токсического и противоопухолевого действий производных хинолина, как и многих других гетероциклов, обусловлен образованием аддуктов с ДНК, последующей фрагментацией молекулы полинуклеотида и апоптозом клетки [6-8]. Внутриклеточная активация ароматических N-содержащих соединений, приводящая к подобному эффекту, происходит при участии цитохрома P450 и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы [9], глутатион-S-трансферазы и хинон-редуктазы [10].

Имеющиеся в литературе сведения по биологической активности N-оксидированных производных хинолина посвящены в основном 4-нитрохинолин-1-оксиду (4-NQO), информация об активности других структурных аналогов реагента практически отсутствует. В связи с этим в настоящем исследовании нами было изучено влияние двух N-оксидированных стирильных производных хинолина (2-(4'-нитростирил)-хинолин-1-оксида – 2-NSQO) и 4-(4'-нитростирил)-хинолин-1-оксида – 4-NSQO) на модуляцию активности микросомальных NADPH-оксидоредуктаз, концентрацию никотинамидных коферментов и запуск процессов апоптоза в эритролейкемических клетках человека 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-глутамин, 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 2-NSQO и 4-NSQO 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 активности каспаз* проводили по методу, описанному ранее [11], с использованием специфических субстратов, меченных флуоресцентной меткой (7-амино-4-трифлуорометилкумарин - AFC) ("BioRad", США), детектируемой по изменению флуоресценции или оптической плотности. Определение активности каспаз-3 и -9 проводили в реакционном буфере, смешивая образец с соответствующим специфическим субстратом. Субстратом для каспазы-3 служил DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), для каспазы-9 – LETD (Leu-Glu-Thr-Asp). Определение количества отщепленного AFC проводили на СФ-46 при  $\lambda=395$  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.

*Определение фрагментации ДНК* проводили по изменению параметров флуоресценции двух ДНК-тропных красителей: бромистого этидия (EtBr) ("Sigma", США) и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) ("Serva", Германия) как описано ранее [12, 11]. Параметры интерференционных светофильтров для DAPI:  $\lambda_{\text{возб.}}$  – 357 нм,  $\lambda_{\text{эмиссии}}$  – 444 нм; для EtBr:  $\lambda_{\text{возб.}}$  – 514 нм,  $\lambda_{\text{эмиссии}}$  – 606 нм. Полосы пропускания для DAPI – 39 нм на возбуждение и 15 нм на эмиссию; для EtBr – 26 нм на возбуждение и 12 нм на эмиссию. Перед внесением красителей

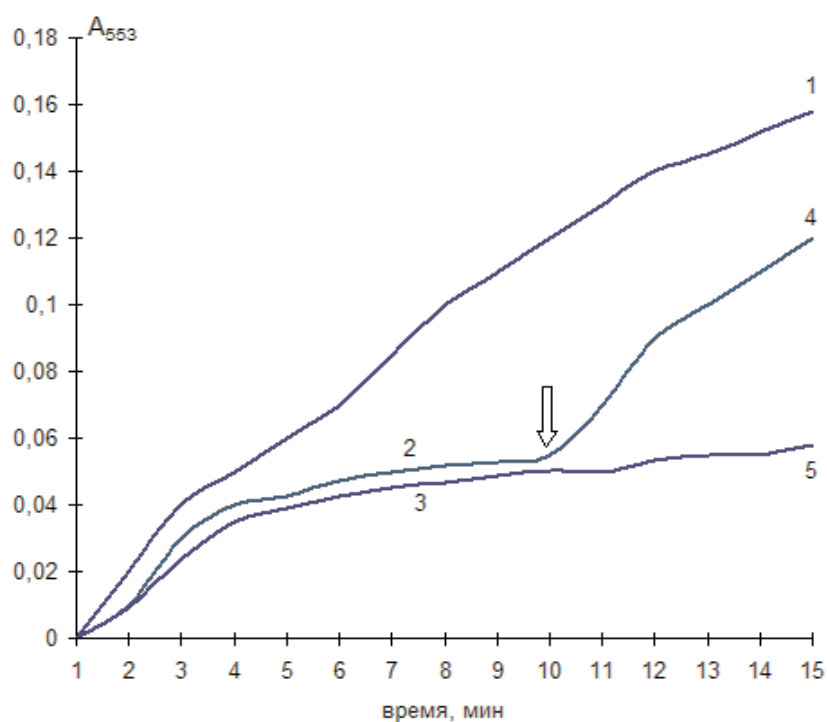
определяли фоновую интенсивность флуоресценции при указанных длинах волн. Параллельно определяли аналогичные параметры в пробах, не содержащих лизатов клеток. Находили  $\Delta\text{EtBr}$  и  $\Delta\text{DAPI}$ , характеризующие изменение флуоресценции красителей при связывании с ДНК по формуле:  $\Delta\text{EtBr}$  ( $\Delta\text{DAPI}$ ) =  $I_1 - I_2 - (I_3 - I_4)$ , где  $I_1$  – интенсивность флуоресценции пробы, содержащей клеточный лизат и EtBr (DAPI);  $I_2$  – интенсивность флуоресценции клеточного лизата;  $I_3$  – интенсивность флуоресценции EtBr (DAPI);  $I_4$  – интенсивность флуоресценции буфера. 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-HCl-ЭДТА-буфере, pH 7,4.

*Определение суммарной внутриклеточной концентрации никотинамидных коферментов  $[\text{NAD}^+ + \text{NADH}]_I$*  проводили по методу Ниссельбаума и Грина [13]. Для построения калибровочной кривой использовали  $\beta\text{-NAD}^+$  (“Serva”, Германия).

*Цитохром с-редуктазную активность микросом* измеряли спектрофотометрически на СФ-46 (“ЛОМО”, Россия) при температуре 25°C. Реакционная среда содержала микросомы (30 мкг белка/мл), NADPH или NADH (50 мкМ), 2-NSQO или 4-NSQO (1-100 мкМ) и цитохром с (20 мкМ).

В работе использовали тритон X-100 (“Ferak”, Германия), трис (“Reanal”, Венгрия), трипановый синий (“Sigma”, США), цитохром с из сердца лошади (“Sigma”, США), NADPH (NADH) (“Serva”, Германия), остальные реактивы отечественного производства квалификации “хч”. Каждый вариант исследовался не менее чем в трех отдельных опытах. При построении графиков использовались усредненные величины. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

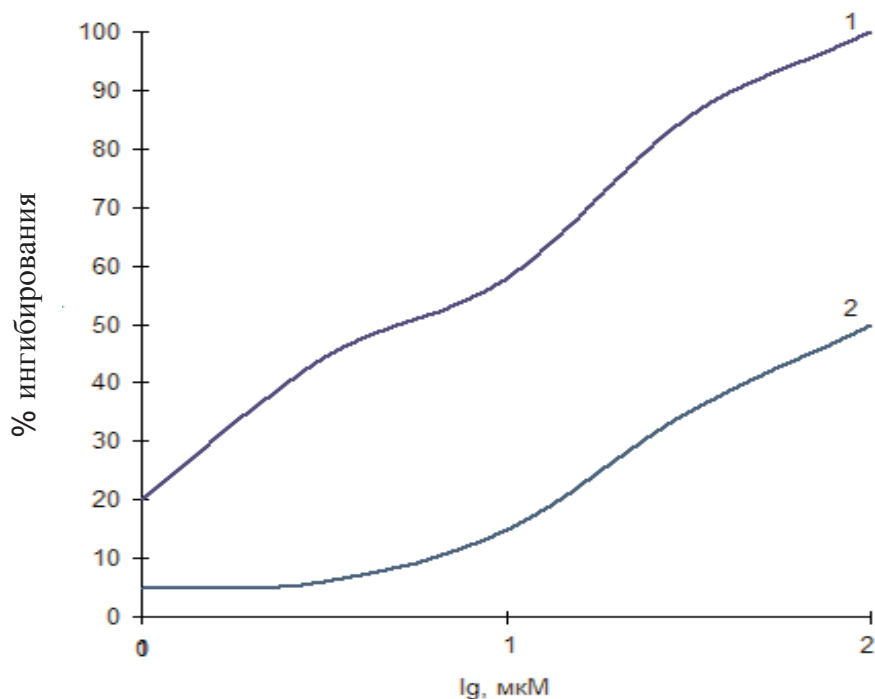
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На рисунке 1 представлен график кинетики восстановления цитохрома с микросомами без и в присутствии 10 мкМ 2-NSQO. Добавление 2-NSQO в среду, содержащую суспензию микросом, NADPH и цитохром с, вызывает снижение скорости восстановления цитохрома с, которое со временем прогрессирует. Следует отметить, что в зависимости от концентрации реагента наибольшее падение скорости происходит в течение первых 1-5 мин реакции. Предынкубация микросом с 2-NSQO в течение 5 мин с последующим внесением в реакционную среду NADPH и цитохрома с не изменяет скорости восстановления белка по сравнению с вышеописанным вариантом. После полного подавления 2-NSQO NADPH-цитохром с-редуктазной активности, добавление в среду инкубации NADH частично возобновляет восстановление цитохрома с. В то время, как повторное добавление NADPH и/или цитохрома с не вызывает повышения скорости реакции ( $p > 0,05$ ) (рис. 1). При использовании вместо 2-NSQO его структурного аналога (4-NSQO) наблюдается аналогичная закономерность, однако, подавление NADPH-цитохром с-редуктазной активности микросом происходит значительно медленнее, и добавление в среду инкубации NADH полностью возобновляет восстановление цитохрома с (данные не представлены). Зависимость NADPH-цитохром с-редуктазной активности от концентрации 2-NSQO и 4-NSQO представлена на рисунке 2. При содержании микросомного белка 30 мкг/мл 2-NSQO в концентрации 10 мкМ подавляет ферментативную активность системы на 50%, в концентрации 50 мкМ и выше активность падает более чем на 80%. 4-NSQO в концентрации 10 мкМ ингибирует ферментативную активность микросом на 15%, а при концентрации 100 мкМ – на 50%. Из представленных результатов следует, что токсическое действие на клетки 2-NSQO и его структурных аналогов может быть связано с необратимым ингибированием микросомальных ферментов с NADPH-цитохром с-редуктазной активностью. При возникновении подобного эффекта в клетках, как правило, нарушается работа всей микросомальной электрон-транспортной цепи, образуется большое количество генотоксических продуктов, в итоге клетка погибает путём апоптоза или некроза.



**Рисунок 1.**

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.



**Рисунок 2.**

Влияние 2-NSQO (1) и 4-NSQO (2) на NADPH-цитохром с-редуктазную активность микросом клеток K562. По оси абсцисс: концентрация 2-NSQO и 4-NSQO, мкМ (логарифмическая шкала); по оси ординат: ингибирование скорости реакции (%) по отношению к контролю. Измерения в системе проводили в первые 5 мин реакции.

Поэтому далее в обработанных 2-NSQO и 4-NSQO клетках K562 нами была определена активность двух внутриклеточных каспаз, участвующих в запуске апоптоза: индуцирующей каспазы-9 и эффекторной каспазы-3. Параллельно были определены уровни параметров флуоресценции EtBr и DAPI при связывании с ДНК, увеличение которых происходит вследствие внутриклеточной фрагментации молекулы полинуклеотида. Из данных, представленных на рисунках 3 и 4, следует, что при обработке опухолевых клеток в течение 2 сут исследуемыми реагентами наблюдается статистически значимое ( $p < 0,01$ ) увеличение активности каспаз-9 и -3 по сравнению с необработанными клетками. Результаты определения уровней флуоресценции EtBr и DAPI при связывании с ДНК клеток также показывают достоверное усиление этого показателя ДНК-тропных красителей (табл. 1). Следует отметить, что жизнеспособность опухолевых клеток во всех исследуемых вариантах не падала ниже 90%. Представленные результаты свидетельствуют о том, что в клетках K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO, имеет место индукция процессов апоптоза.

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции EtBr и DAPI нуклеоидов клеток K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO течение 2-х сут. инкубации.

Реагент, мкМ	Интенсивность флуоресценции	
	EtBr	DAPI
—	$3,5 \pm 0,4$	$27,6 \pm 0,8$
<b>2-NSQO (10)</b>	$13,1 \pm 0,8^{**}$	$39,2 \pm 1,3^*$
<b>4-NSQO (10)</b>	$11,6 \pm 0,7^{**}$	$37,1 \pm 1,1^*$

Примечание: здесь и далее достоверность различий \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по отношению к контролю (необработанные клетки K562).

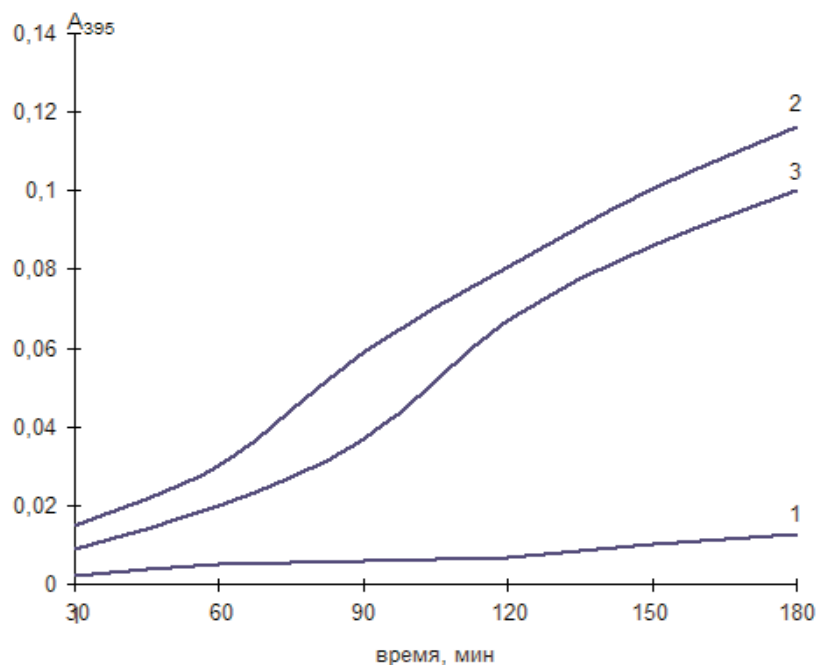


Рисунок 3.

Изменение активности каспазы-9 в клетках K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO в течение 2-х суток инкубации. По оси ординат: изменение поглощения отщепленного AFC, определенное при 395 нм. 1 - базовый уровень каспазы-9 для нестимулированных клеток (контроль); 2 - активность каспазы-9 в клетках, обработанных 10 мкМ 2-NSQO; 3 - активность каспазы-9 в клетках, обработанных 10 мкМ 4-NSQO.

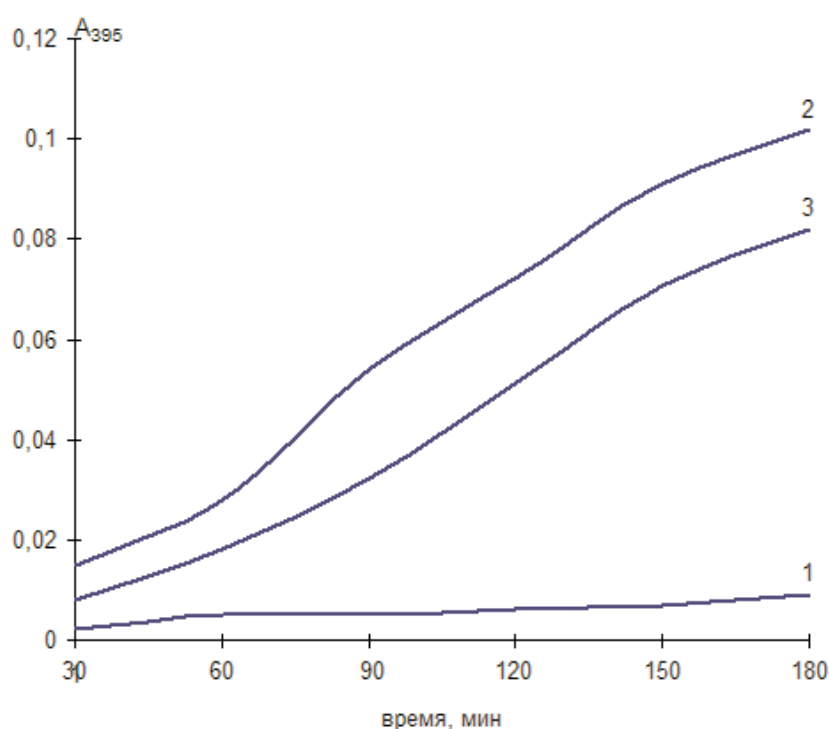


Рисунок 4.

Изменение активности каспазы-3 в клетках K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO в течение 2-х суток инкубации. По оси ординат: изменение поглощения отщепленного AFC, определенное при 395 нм. 1 - базовый уровень каспазы-3 для нестимулированных клеток (контроль); 2 - активность каспазы-3 в клетках, обработанных 10 мкМ 2-NSQO; 3 - активность каспазы-3 в клетках, обработанных 10 мкМ 4-NSQO.

Таблица 2. Концентрация никотинамидных коферментов  $[NAD^+ + NADH]_i$  в опухолевых клетках K562, обработанных 2-NSQO и 4-NSQO в течение 2-х суток инкубации.

Реагент, (мкМ)	$[NAD^+ + NADH]_i$ , мкг/ $10^5$ клеток
—	<b>0,174±0,003</b>
<b>2-NSQO (10)</b>	<b>0,136±0,003*</b>
<b>4-NSQO (10)</b>	<b>0,142±0,004*</b>

Известно, что белки-предшественники каспаз обычно активируются путём протеолиза или образования димерных/олигомерных комплексов. Так, в присутствии АТФ и цитохрома с прокаспаза-9 взаимодействует с адаптерным белком Араф-1, превращается в каспазу-9 и инициирует последующий каскад биохимических реакций с участием каспаз-3, -6 и -7 [14]. Одним из клеточных субстратов каспазы-3 является поли(АДР-рибозо)-полимераза (PARP) – фермент, играющий важную роль в процессах репарации ДНК, благодаря способности регулировать активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы [15]. Апоптоз и репарация являются энергозависимыми процессами, протекают с потреблением АТФ, а также никотинамидных коферментов, и в ряде случаев конкурируют за использование указанных соединений [16]. С другой стороны, процесс репарации может быть включен в апоптоз в качестве необходимого элемента [17]. Поэтому в настоящем исследовании нами также было изучено влияние 2-NSQO и 4-NSQO на концентрацию никотинамидных коферментов в



клетках K562. Определение концентрации  $[NAD^+ + NADH]_t$  на 1-е сут инкубации выявило достоверное снижение данного показателя во всех вариантах обработки опухолевых клеток производными хинолина по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что PARP может использовать никотинамидную компоненту  $NAD^+$  до апоптотической активации каспаз, в частности каспазы-3, далее фермент инактивируется.

Таким образом, исследуемые в настоящей работе производные хинолин-N-оксида (2-NSQO и 4-NSQO) проявляют по отношению к клеткам K562 выраженный апоптогенный эффект. Клеточные механизмы индукции апоптоза в данном случае связаны с образованием генотоксических агентов, снижением концентрации никотинамидных коферментов в клетках, активацией каспаз-9 и -3 и последующей фрагментацией ДНК. Уровни активации каспаз, а также степень фрагментации ДНК при обработке опухолевых клеток 2-NSQO и 4-NSQO идентичны. Однако результаты по влиянию соединений на активность микросомальных NADPH-оксидоредуктаз показали, что 4-NSQO является для клеток менее токсичным реагентом по сравнению с 2-NSQO. Не исключено, что обнаруженный эффект 4-NSQO может быть связан с особенностями влияния на функционирование двухкомпонентной клеточной системы NADPH-цитохром P450-редуктаза/цитохром P450, участвующей в метаболической активации данного реагента.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 02-04-4999) и гранта Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-894.2003.4).

## 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. *Garcia-Bermejo L., Vilaboa N.E., Perez C. et al.* (1997) Exp. Cell Res., **236**, 268-274.
4. *Анисимов А.Г., Болотников И.А., Чекмасова А.А. и др.* (2000) Цитология, **42**, 10, 923-936.
5. *Тюляндин С.А.* (2003) Практическая онкология, **3**, 4, 236-245.
6. *Heidelberger C.* (1980) J. Environ. Path. Toxicol., **3**, 4, 69-87.
7. *Ashurst S.W., Cohen. G.M.* (1981) Int. J. Cancer, **28**, 387-392.
8. *Волкова Т.О., Малышева И.Е.* (2002) Вест. мол. ученых. Серия "Науки о жизни", **4**, 58-63.
9. *Joseph P.D., Evans D.H., Williamson V. et al.* (1999) Mutat. Res., **429**, 2, 199-208.
10. *Kawabata K., Tanaka T., Honjo S. et al.* (1999) J. Cancer, **83**, 3, 381-386.
11. *Волкова Т.О., Малышева И.Е.* (2002) Вопр. мед. хим., **48**, 586-593.
12. *Анисимов А.Г., Болотников И.А.* (1999) Цитология, **41**, № 8, 680-684.
13. *Nisselbaum J.S., Green S.* (1969) Analyt. Biochem., **27**, 212-217.
14. *Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. et al.* (1998) Mol. Cell., **1**, 949-957.
15. *Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B.A. et al.* (2000) J. Biol. Chem., **275**, 28, 21302-21308.
16. *Richter C., Schweizer M., Cossarizza A. et al.* (1996) FEBS Lett., **378**, 107-110.
17. *Тронов В.А.* (1999) Цитология, **41**, 5, 405-411.

Поступила: 03. 01. 2004

CELL MECHANISMS UNDERLYING INDUCTION OF APOPTOSIS IN HUMAN  
ERYTHROLEUKAEMIC K562 CELLS LINE TREATED BY  
QUINOLINE-N-OXIDE DERIVATIVES

*T.O. Volkova, N.S. Zykina, I.E. Malycheva, N.N. Nemova*

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

We have studied the influence of 2-(4'-nitrostyryl)-quinoline-1-oxide (2-NSQO) and 4-(4'-nitrostyryl)-quinoline-1-oxide (4-NSQO) on modulation activity of microsomal NADPH-oxidoreductases, concentration of nicotinamide enzymes and induction of apoptosis in human erythroleukaemic K562 cells. It was shown, that activity of microsomal NADPH-cytochrome c-reductases in cancer cells was inhibited by 10  $\mu$ M 4-NSQO (15%), and 10  $\mu$ M 2-NSQO (50%). Treatment of cells with these reagents for two days, was accompanied by caspases-9 and -3 activation, rise of EtBr and DAPI fluorescence related to DNA binding and induction of apoptosis. Apoptosis was preceded by the decrease of concentration of nicotinamide enzymes. Thus 4-NSQO is a promising compound for further experimental trials as an anticancer drug with low toxic action on the tissues of organism.

**Key words:** cancer cell lines, apoptosis, caspases, NADPH-dependent reductases, quinoline-N-oxide derivatives.