

УДК 616-006.441:616.056.552+615.227.3+615.276

*Ростислав ПАНЧУК, Наталія БОЙКО, Ростислав СТОЙКА*

## **МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА КЛІТИННОГО ЦИКЛУ В КЛІТИНАХ МИШАЧОЇ ЛІМФОМИ NK/LY ЗА УМОВ ХІМІОТЕРАПІЇ *IN VIVO***

*Інститут біології клітини НАН України*

*Досліджено молекулярні механізми, за допомогою яких реалізується цитотоксична дія протипухлинних препаратів вінкристину і доксорубіцину на клітини мишачої лімфоми NK/Ly за умов хіміотерапії *in vivo*. З'ясовано, що доксорубіцин пригнічує експресію компонентів сигнального шляху інтерлейкіна-6 та елементів MAP-кіназного каскаду у пухлинних клітинах, а також призводить до зупинки цих клітин на переході G2/M клітинного циклу. На відміну від доксорубіцину вінкристин призводить до зупинки цих клітин у фазі G1/S, підвищення рівня білків pSTAT3 (Ser 727) і c-Myc, задіяних у сигнальному шляху IL-6 та регуляції проліферативної активності клітин. Вважаємо, що це допомагає клітинам лімфоми NK/Ly уникнути негайного апоптозу, однак сприяє суттєвому зростанню кількості гігантських (поліплоїдних) клітин, вміст яких може досягати 80% в популяції лімфомних клітин.*

*Ключові слова: пухлина, мишача лімфома, клітинний цикл, проліферація, механізми, хіміотерапія, доксорубіцин, вінкристин.*

Сьогодні хіміотерапія – головний метод лікування онкологічних хворих, хоча розроблені протипухлинні препарати не завжди забезпечують повне виліковування. В окремих випадках курс хіміотерапії погіршує загальний стан пацієнтів, призводячи до ендогенної інтоксикації організму. Мишача лімфома NK/Ly – перспективна модельна пухлина для дослідження антинеопластичної активності експериментальних лікувальних препаратів у динаміці *in vivo*. Її вперше запропонували Немет і Кельнер у 1961 р. [7]. Раніше ми дослідили, що розвиток лімфоми NK/Ly у тварин-пухлиноносіїв супроводжується ендогенною інтоксикацією, симптоми якої нагадують кахексію в онкологічних хворих. [8]. Одержані дані дають підстави стверджувати, що головну роль у цьому процесі відіграє прозапальний цитокін IL-6, який діє як автокринний фактор росту для лімфомних клітин і водночас є важливим індуктором запальних процесів в організмі тварин-пухлиноносіїв [3]. Найефективнішим у лікуванні лімфоми NK/Ly виявився антрацикліновий антибіотик доксорубіцин, тоді як цитостатик вінкристин мав слабший ефект. Синтетичний стероїд дексаметазон ефективно пригнічував продукцію цитокіну IL-6, однак не виявляв вираженої терапевтичної дії [4]. Щоб дослідити молекулярні механізми, якими можна пояснити згадані відмінності в цитотоксичній дії цих протипухлинних препаратів на клітини лімфоми NK/Ly, проводили Вестерн-блот аналіз клітин-

них білків із використанням специфічних антитіл до специфічних білків, задіяних у регуляції клітинного циклу та проліферації.

### Матеріали та методи дослідження

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

Експериментальних тварин утримували відповідно до нормативів законодавства України [1], 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 (1-й пасаж), 13–14 (2-й пасаж) та 20–21 (3-й пасаж) дні після інокуляції пухлини. Протипухлинні препарати доксорубіцин (Ebeve, Австрія), вінкрисин (Richter, Німеччина) та дексаметазон («Дарниця», Україна) придбали у ліцензованих аптеках. Курс хіміотерапії складався з 10 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 стосовно першого, щоб 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)). Білкові лізати клітин аналізували, як описано Леммлі [6] 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). Після цього мембрану інкубували за наявності специфічних моноклональних кролячих антитіл до фосфорильованих форм білків pSTAT1 (Туг 701), pSTAT3 (Туг 705) та pSTAT3 (Ser 727), кінази MAP-кінази (MEK 1/2), мітоген-активованої протеїнкінази p42/p44 ERK 1/2, кінази Cdc2 (Туг 15) (Cell Signaling, США), транскрипційних факторів E2F1/2, c-Мус, (Santa Cruz Biotech, США) та β-актину (Sigma, США) протягом 12 год. при 4 °С при повільному перемішуванні. Також використовували моноклональні мишачі антитіла до білка Cdc2 (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 визначали за допомогою хемілюмінесценції, яку виявляли на рентгенівській плівці (FujiFilm, Японія). Вирівнювання кількості нанесеного білка проводили, враховуючи рівень експресії β-актину в тих самих електрофоретичних зразках.

### Результати й обговорення

У клітинах лімфому NK/Ly, отриманих із тварин, які проходили курс лікування доксорубіцином, виявлено зниження рівня білків, задіяних у регуляції проліферативної активності. Зокрема, рівень транскрипційних факторів c-Мус, E2F-1/2 помітно знижувався за умов хіміотерапії доксорубіцином порівняно з контролем, а в

клітинах, одержаних на 20–21 день після інокуляції, ці регуляторні білки були повністю відсутні. Очевидно, сигнальний шлях ІЛ-6 у цих пухлинних клітинах не задіяний, про що свідчить відсутність у них експресії фосфорильованих форм регуляторних білків STAT, а також компонентів MAP-кіназного регуляторного каскаду (рис. 1). Це узгоджується з результатами, які ми отримали, де хіміотерапія доксорубіцином призводила до суттєвого зниження рівня ІЛ-6 в асцитній рідині мишей-пухлиноносіїв [4]. Причиною цього може бути зупинка пухлинних клітин у фазі G2/M, спричинена доксорубіцином, а також індукція в них апоптозу [2]. На користь такого висновку свідчать також результати Вестерн-блот аналізу з використанням антитіл до фосфорильованої та нативної форм протеїнкінази Cdc2 (рис. 2, 3).

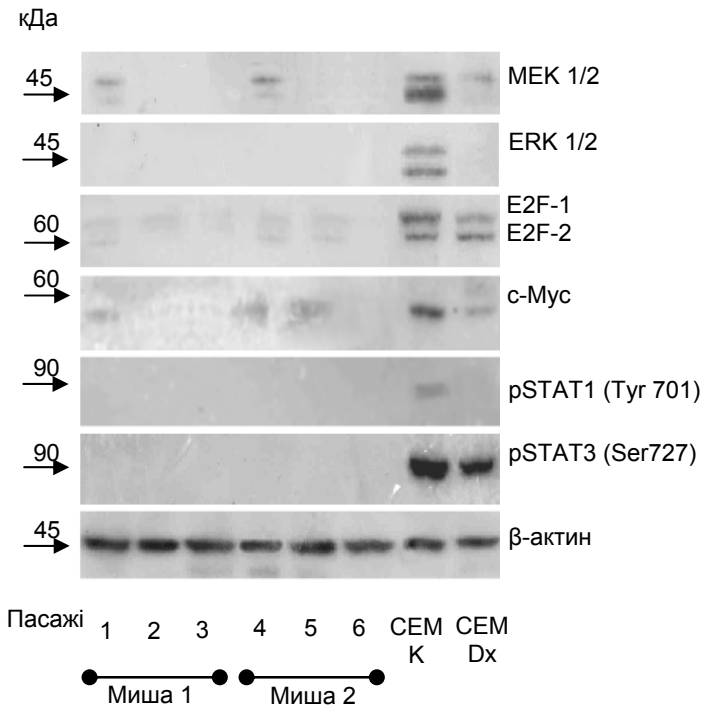
Варто зазначити, що виявлені нами зміни в експресії білків у клітинах лімфоми NK/Ly за умов монотерапії доксорубіцином помітно не відрізнялися від таких змін під час застосування комбінованої хіміотерапії доксорубіцином і дексаметазоном (рис. 1, 2).

У тварин, яким вводили вінкристин, на термінальній стадії пухлинного росту виявили зростання рівня pSTAT3 (Ser 727) (рис. 4), тоді як у тварин, що отримували вінкристин у поєднанні з дексаметазоном на цій стадії росту лімфоми, простежувалось деяке зниження рівня pSTAT3 (Ser 727). Цю різницю можна пояснити блокуванням сигнального шляху ІЛ-6 дексаметазоном (рис. 4, 5). Експресія фактора с-Мус залишалася на стабільно високому рівні протягом усього курсу лікування вінкристином (рис. 5). Активація pSTAT3 у цих пухлинних клітинах може частково бути зумовлена дією ІЛ-6 та впливом несприятливих чинників, наприклад, цитостатика вінкристину, який, як відомо, блокує деполімеризацію мітотичного веретена клітин у процесі клітинного поділу.

Клітини ссавців здатні виконувати мітоз навіть за дії цитостатиків, але після такого вимушеного поділу їхній розвиток зупиняється у фазі G<sub>1</sub>/S [5]. Вестерн-блот аналіз із застосуванням антитіл до фосфорильованої форми протеїнкінази Cdc2 підтвердив наведені вище припущення, і показав, що значна частина лімфомних клітин мишей-пухлиноносіїв при лікуванні вінкристином перебуває у фазі G<sub>1</sub>/S. Про це свідчить зростання рівня фосфорильованої форми Cdc2 (рис. 6, 7).

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%. Після дії доксорубіцину клітини NK/Ly характеризувалися фрагментацією ядра, конденсацією хроматину, інтенсивним утворенням пухирів на своїй поверхні (блеббінг), що свідчить про проходження в них класичного апоптозу, опосередкованого каспазами [2].

На відміну від доксорубіцину, вінкристин (1 мг/кг, 10 ін'єкцій через день) призводив до суттєвого зростання кількості клітин із збільшеними розмірами (до 80%). Цитоморфологічне дослідження показало принципово інші деструктивні процеси, які відбуваються в клітинах-мішенях під дією вінкристину. У таких клітин простежуються порушення розходження хромосом та їх передчасна конденсація, аномальна структура ядра з ділянками гіперконденсованого хроматину та інші зміни. Подібні, однак слабше виражені морфологічні зміни також були виявлені при дослідженні лімфомних клітин, отриманих у контрольних тварин [8]. Це типові ознаки процесу, який назвали мітотична катастрофа, і вони подібні до апоптозу [9].



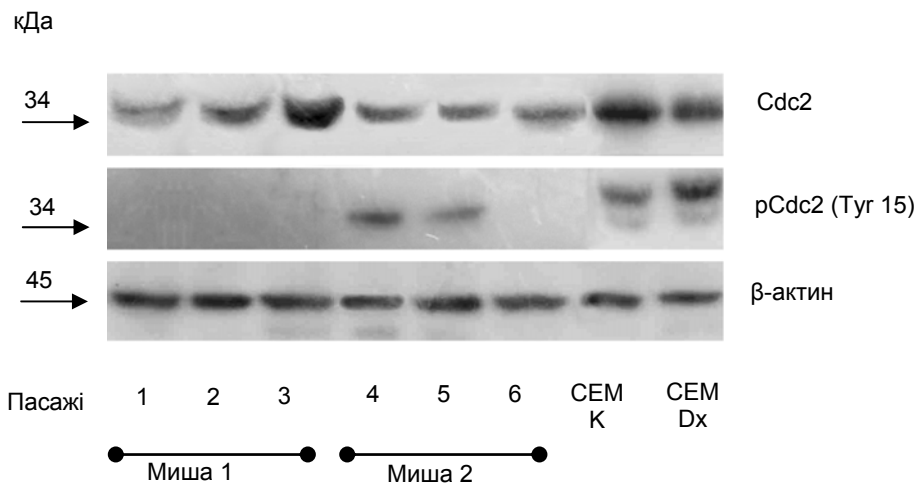
**Рис. 1.** Вестерн-блот аналіз білків, задіяних у регуляції проліферації клітин лімфоми NK/Лу за умов лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином та дексаметазоном. На рис. Показано типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин.

- 1 – 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);
- 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/м<sup>2</sup>, 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/м<sup>2</sup>, 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/м<sup>2</sup>, 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми);

Стрілками показано розташування маркерів молекулярної маси білків

CEM K – клітини Т-лейкемії людини лінії CCRF-CEM, позитивний контроль;

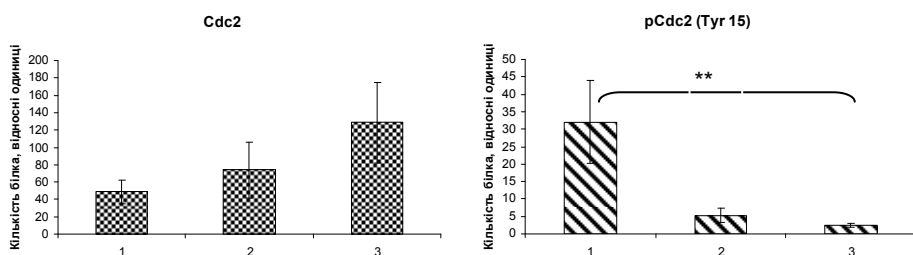
CEM Dx – клітини лінії CCRF-CEM, після дії доксорубіцину (2 мкг/мл) (негативний контроль).



**Рис. 2.** Вестерн-блот аналіз нативної та фосфорильованої за залишком Тир 15 кінази Cdc2 за умов лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином та дексаметазоном. На рис. показано типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин: 1–6 – як на рис. 1

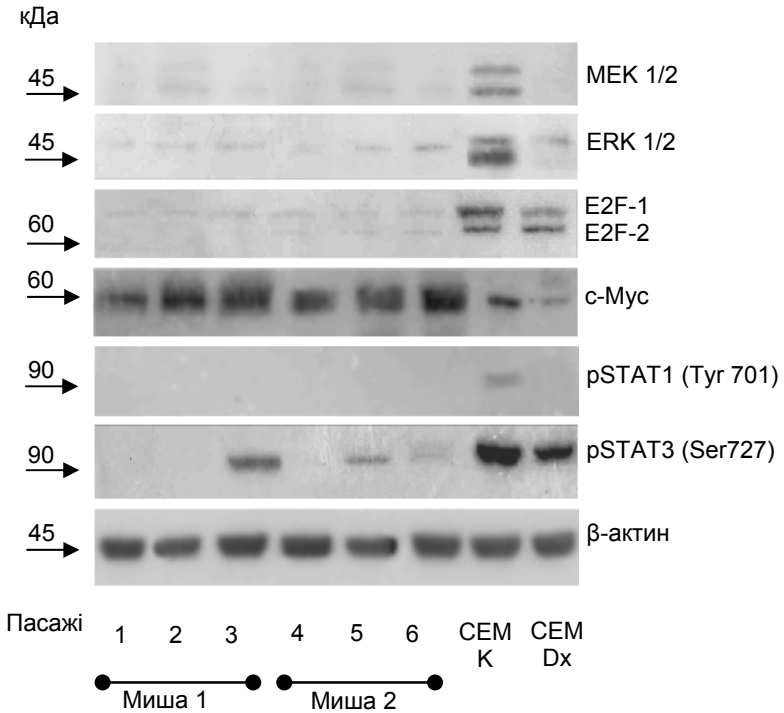
Стрілками показано розташування маркерів молекулярної маси білків.

СЕМ К – клітини Т-лейкемії людини лінії CCRF-СЕМ, позитивний контроль;  
СЕМ Dx – клітини лінії CCRF-СЕМ, після дії доксорубіцину (2 мкг/мл) (негативний контроль).



**Рис. 3.** Денситометрична обробка результатів Вестерн-блот аналізу нативної та фосфорильованої за залишком Тир-15 кінази Cdc2 у клітинах ліфому NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином та дексаметазоном. Дані нормалізовано стосовно рівня β-актину у тих самих клітинах.

- 1 – 1-й пасаж (7–8 днів після інюкаляції пухлини);
- 2 – 2-й пасаж (13–14 днів після інюкаляції пухлини);
- 3 – 3-й пасаж (20–21 день після інюкаляції пухлини).

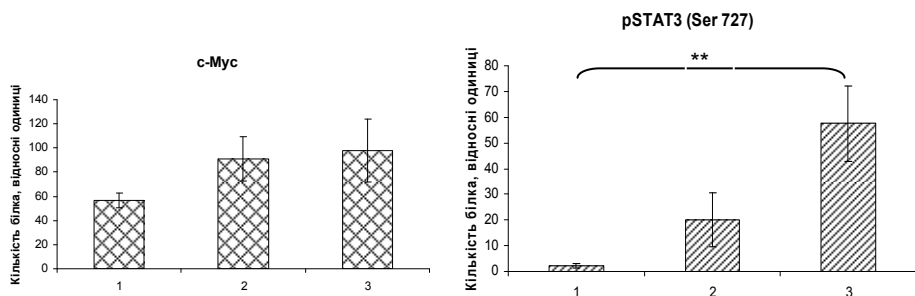


**Рис. 4.** Вестерн-блот аналіз білків, задіяних у регуляції проліферації клітин лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносіїв вінкристином та дексаметазоном. На рис. показано типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин:

- 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/м<sup>2</sup>, 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);
- 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/м<sup>2</sup>, 10 ін'єкцій через день з 6-го дня після інокуляції лімфоми);

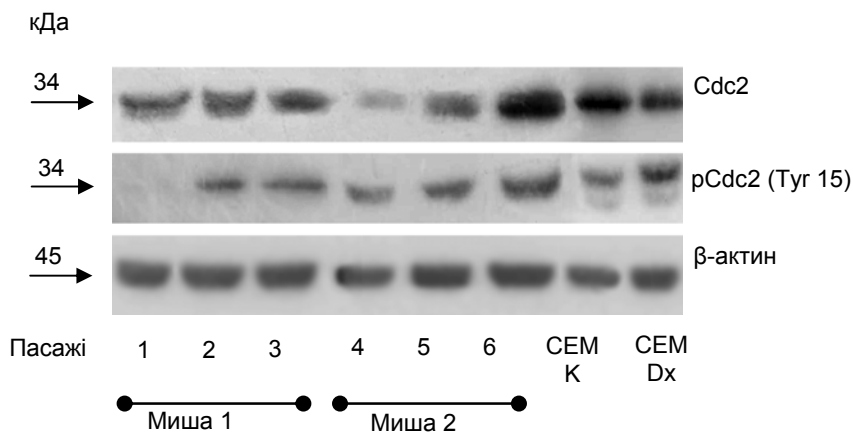
SEM K – клітини T-лейкемії людини лінії CCRF-SEM, позитивний контроль;

SEM Dх – клітини лінії CCRF-SEM, після дії доксорубіцину (2 мкг/мл) (негативний контроль).



**Рис. 5.** Денситометрична обробка результатів Вестерн-блот аналізу білків, задіяних у регуляції проліферації клітин у клітинах лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносців вінкристином та дексаметазоном. Дані нормалізовано стосовно рівня  $\beta$ -актину у тих самих клітинах:

- 1 – 1-й пасажи (7–8 днів після інокуляції пухлини);
- 2 – 2-й пасажи (13–14 днів після інокуляції пухлини);
- 3 – 3-й пасажи (20–21 день після інокуляції пухлини).



**Рис. 6.** Вестерн-блот аналіз нативної та фосфорильованої за залишком Tyr 15 кінази Cdc2 за умов лікування тварин-пухлиноносців вінкристином та дексаметазоном. На рис. показано типову електрофореграму цих клітинних білків у 2-х із 6-ти експериментальних тварин: 1–6 – як на рис. 4

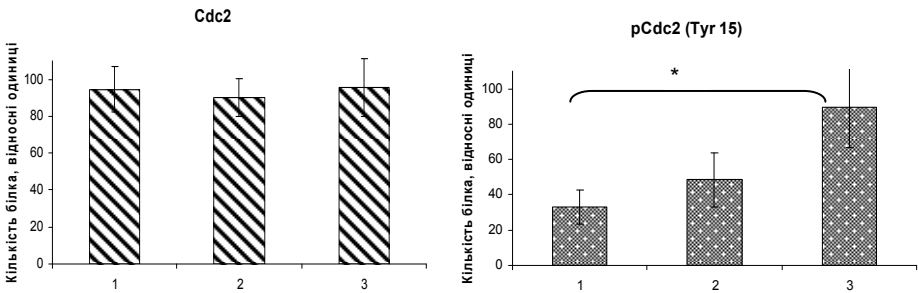
Стрілками показано розташування маркерів молекулярної маси білків.

CEM K – клітини T-лейкемії людини лінії CCRF-CEM, позитивний контроль;

CEM Dx – клітини лінії CCRF-CEM, після дії доксорубіцину (2 мкг/мл) (негативний контроль).

Отже, ми показали, що протипухлинні препарати доксорубіцину і вінкристину виявляють протилежний вплив на проліферацію і клітинний цикл клітин лімфоми NK/Ly. Доксорубіцин призводить до повного інгібування внутрішньоклітинного шляху інтерлейкіну-6 – цитокіну, який задіяний в автокринній регуляції росту лім-

фомних клітин, а також до пригнічення експресії транскрипційних факторів E2F-1/2 та с-Мус. Такий ефект цього протипухлинного препарату, очевидно, зумовлений зупинкою пухлинних клітин у переході G2/M клітинного циклу та ймовірною індукцією ним каспазо-залежного апоптозу. На відміну від доксорубіцину, вінкрисдин призводить до активації сигнального шляху IL-6 та гіперекспресії транскрипційного фактора с-Мус, що дає змогу цим клітинам певний час пережити несприятливі умови, зумовлені цитотоксичним ефектом вінкрисдину. Цим, очевидно, можна пояснити нижчу ефективність хіміотерапії вінкрисдином порівняно з хіміотерапією доксорубіцином. Водночас, за умов дефіциту метаболітів, необхідних для підтримання клітинного функціонування [3], та гіперекспресії прото-онкобілка с-Мус пухлинні клітини можуть вступати на шлях мітотичної катастрофи – контрольованої загибелі клітин, яка відбувається без участі каспаз. Тому ми припускаємо, що після курсу лікування мишей-пухлиноносійів вінкрисдином лімфомні клітини з часом гинуть шляхом мітотичної катастрофи.



**Рис. 7.** Денситометрична обробка результатів Вестерн-блот аналізу нативної та фосфорильованої за залишком Tyr-15 кінрази Cdc2 у клітинах лімфоми NK/Ly за умов лікування тварин-пухлиноносійів вінкрисдином та дексаметазоном. Дані нормалізовано стосовно рівня  $\beta$ -актину у тих самих 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).

### Подяки

Автори статті висловлюють подяку проф. Луцику М.Д. (Інститут біології клітини НАН України) за допомогу та цінні поради в ході виконання цієї праці. Робота виконана за часткової підтримки Західно-Українського Біомедичного Центру.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006. – № 27. – С. 230.
2. 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. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : Спец. 03.00.11 „Цитологія, клітинна біологія, гістологія”. – Львів, 2008. — 20 с.



3. Панчук Р.Р., Бойко Н. М., Луцик М. Д., Стойка Р.С. Молекулярні процеси залучення інтерлейкіну-6 у процеси розвитку мишачої лімфому НК/Лу // Клін. та експер. Патологія. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 144–149.
4. 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. – Т. XVIII. – С. 209–218.
5. Blajeski A. L., Phan V. A., Kottke T. J. et al. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells // J Clin Invest. – 2002. – Vol. 110, № 1. – P. 91–99.
6. Laemmli U. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–684.
7. Nemeth L., Kellner B. A new mouse ascites tumor to be used as screening tool // Neoplasma. – 1961. – Vol. 8. – P. 337–343.
8. 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. – Vol. 2, № 1. – P. 71–86.
9. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe // Cell Death Differ. – 2008. – Vol. 15, № 7. – P. 1153–1162.

#### SUMMARY

Rostyslav PANCHUK, Natalia BOIKO, Rostyslav STOIKA

#### MOLECULAR MECHANISMS OF CELL CYCLE REGULATION AND PROLIFERATION IN MURINE NK/LY LYMPHOMA DURING CHEMOTHERAPY *IN VIVO*

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine*

The molecular mechanisms of cytotoxic action of anticancer drugs doxorubicin and vincristine towards murine NK/Ly lymphoma cells *in vivo* were studied. It was shown that doxorubicin inhibited expression of components of IL-6 signaling pathway, as well as components of MAPK signaling pathway. Tumor cells were blocked in G2/M phase after doxorubicin treatment, as revealed by Western-blot analysis with antibodies to Cdc2 and pCdc2 (Tyr 15). In contrast to doxorubicin, vincristine induced G1/S block of lymphoma cells and increased expression of transcription factors pSTAT3 (Ser 727) and c-Myc, that are involved in IL-6 signaling pathway and regulation of cell proliferation, correspondingly. We suggest that such action of vincristine allows tumor cells to escape imminent apoptosis. However, vincristine treatment also led to an increase (up to 80%) in ratio of giant (polyploid) cells in total NK/Ly lymphoma cell population.

Key words: tumor, murine lymphoma, cell cycle, proliferation, mechanisms, chemotherapy, doxorubicin, vincristine.