

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ U-937 ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ

© О. А. Ковалева, Я. С. Ясинский, Н. А. Безденежных, Ю. И. Кудрявец

*Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;
электронный адрес: strukov2002@mail.ru*

Выполнен сравнительный анализ частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клеточных популяциях постоянной клеточной линии U-937 в контрольных условиях и после влияния фактора некроза опухоли (ФНО). Обнаружено, что при такой обработке максимальный эффект наблюдается через 48 ч и выражается в стимуляции апоптоза, накоплении клеток с микроядрами и клеток двуядерных, при этом индукция преждевременной конденсации хромосом является ранним маркером действия ФНО. Изменение клеточного состава популяции по числу хромосом может привести к появлению сублинии с новыми свойствами по сравнению с исходной клеточной популяцией.

Ключевые слова: клеточная линия U-937, ФНО, цитогенетические аномалии.

Принятые сокращения: ДК — двуядерные клетки, МЯ — микроядра, ПКХ — преждевременная конденсация хромосом, ФНО — фактор некроза опухоли.

Эпигенетическая и генетическая гетерогенность является общей чертой опухолевых клеток. Их изменчивость лежит в основе опухолевой прогрессии и накопления клеточных клонов с повышенной агрессивностью к организму опухоленосителя, однако механизмы генерации такой гетерогенности до сих пор остаются недостаточно исследованными.

Ранее нами были получены данные, позволяющие предполагать, что такая цитогенетическая аномалия, как повышенная частота встречаемости клеток с преждевременной конденсацией хромосом (ПКХ) по отношению к митотическим клеткам, может быть связана с повышенной генетической гетерогенностью в клональном потомстве таких клеток (Kovaleva et al., 2007). В литературе имеются данные о том, что высокая частота встречаемости спонтанной ПКХ типична для опухолевых клеток, связана с дефектом «точки проверки» на границе фаз G₂/M клеточного цикла (с дисфункцией белка TP53, накоплением циклина В1, активацией циклинзависимой киназы cdc2) и служит одним из источников генетической гетерогенности, иммортализации и адаптации клеточных популяций к различным условиям химио- и радиотерапии опухолей (Ianzini, Mackey, 1998; Erenpreisa, Cragg, 2001; Erenpreisa et al., 2005; Ianzini et al., 2006).

С функцией фактора некроза опухоли (ФНО) тесно связана индукция апоптоза в опухолевых клонах, гетерогенных по ряду кариотипических, иммунофенотипических и морфологических характеристик у пациентов с миелоидными лейкомиями (Altucci et al., 2005); в то же время клетки разнятся по чувствительности к апоптотическому действию ФНО (Altucci et al., 2005; Kawamata

et al., 2007). В литературе имеются данные об устойчивости клеток лимфомы человека не только к ФНО, но и к некоторым химиотерапевтическим препаратам (Wright et al., 1992). Исходя из этого можно ожидать, что культивирование клеток с ФНО способствует накоплению клонов со сниженной чувствительностью к апоптотическому действию этого фактора. Очень важно исследование этого факта, поскольку ФНО является провоспалительным мультифункциональным цитокином и его часто находят в крови больных с опухолями различных локализаций. Уровень ФНО, по некоторым данным, прямо коррелирует с развитием метастатического процесса (Семесюк, Жильчук и др., 2012), при этом его влияние на клеточном уровне, в том числе и на цитогенетические характеристики опухолевых клеток, остается недостаточно изученным.

Для того чтобы оценить возможность ФНО изменять клональную структуру клеточных популяций не только путем индукции апоптоза чувствительных к нему клеток, но и увеличением клеток с ПКХ, потомство которых может отличаться повышенной генетической изменчивостью, в настоящей работе выполнен сравнительный анализ цитогенетических характеристик клеток лимфомы человека (линия U-937) в контроле и после действия ФНО.

Данная линия получена в 1974 г. из клеток лимфомы человека, описан ее кариотип: по количеству хромосом это околотриплоидная клеточная линия, доля полиплоидных клеток — 2.7%. Линия U-937 относится к редким постоянным клеточным линиям опухолей человека, которые сохраняют дифференцировочные характеристики и могут быть стимулированы разными индукторами, в том

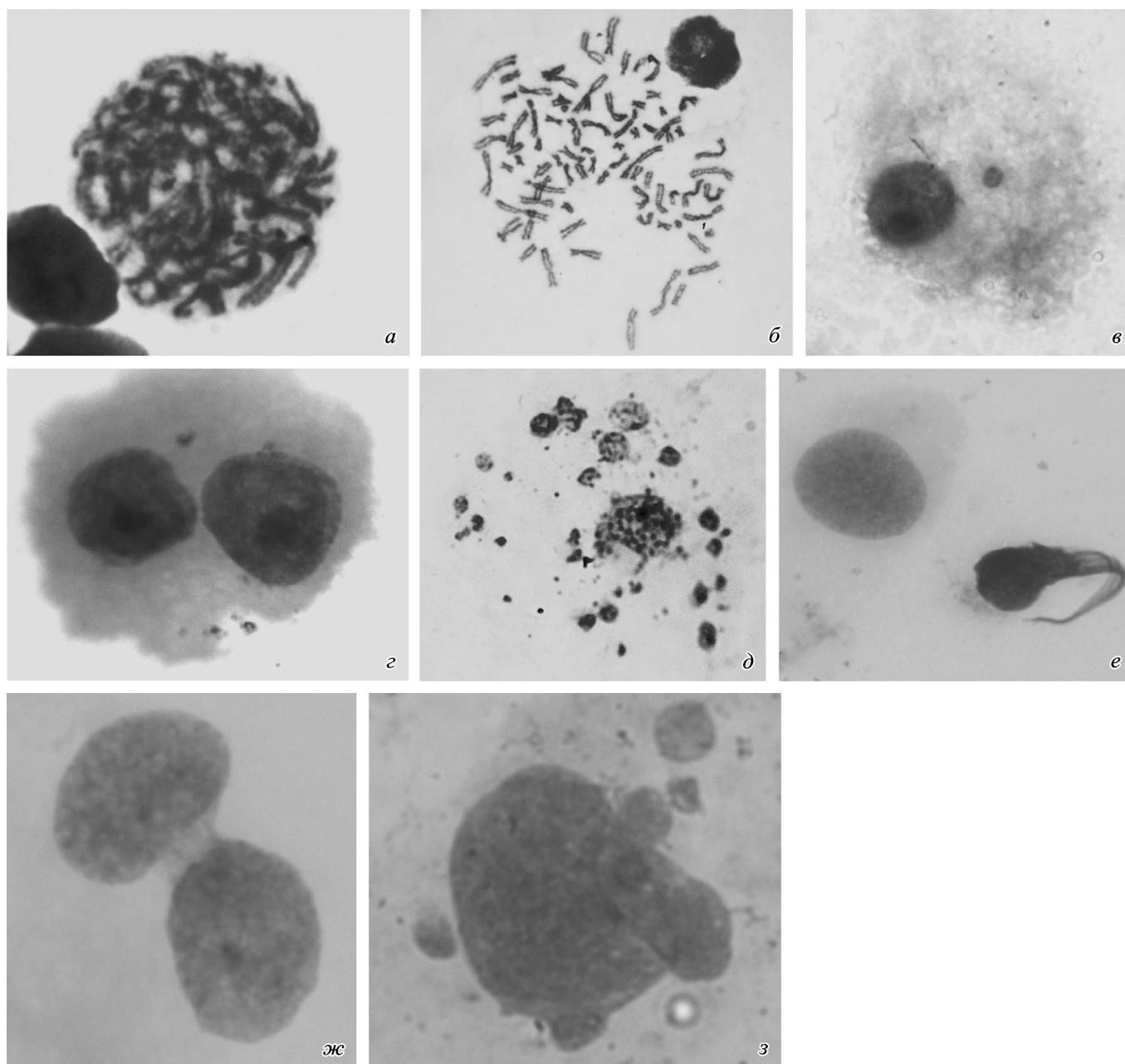


Рис. 1. Морфологические особенности клеточной линии U-937: преждевременная конденсация хромосом (а), метафаза (б), микроядро в клетке (в), двуядерная клетка (г), апоптотическая клетка (д), ядро с хвостом (е), нуклеосомный мост (ж), клетка с ядерными протрузиями и микроядрами (з).

Об. 100×.

числе и ФНО, к терминальной дифференцировке в условиях *in vitro* (Sundstrom, Nilsson, 1976; Soranzo et al., 1990).

Материал и методика

Использовали клетки постоянной клеточной линии человека U-937, полученной из Клеточного банка линий из тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины.

Для культивирования клеток, действия исследуемого агента (при 37 °С в увлажненной атмосфере 5%-ного

CO₂), электрофореза и приготовления препаратов использовали питательную среду RPMI-1640, сыворотку эмбриона телят, агарозу для электрофореза, 0.5-кратный буферный раствор TBE (Sigma, США), гентамицин (Дарница, Украина), ФНО (TNF GF023 Recombinant Human TNF-alpha, Chemicon International, США), трипсин 0.25 % (СПОФА, Чехия), бромистый этидий (Amresco, США), KCl и уксусную ледяную кислоту квалификации х. ч., метанол квалификации ч. д. а. (АЛЬФАРУС, Украина) и краситель Giemsa (Mers, Германия).

ФНО в дозе 500 М. ед. (Международные ед.) вводили в среду культивирования. Проводили 2 варианта экспериментов: с краткосрочным действием ФНО на клетки

(в течение 1, 2 и 6 ч) и длительным действием (в течение 24, 48 и 96 ч). В каждой серии в качестве контроля использовали клетки этой же линии U-937 без добавления ФНО.

Для определения паттерна расщепления ДНК препараты лизированных клеток подвергали электрофорезу в постоянном поле. Электрофорез проводили в 1.4%-ной агарозе при напряжении 50 В на протяжении 4—5 ч с использованием 0.5-кратного буфера TBE. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, просматривали с помощью ультрафиолетового трансиллюминатора и фотографировали.

Препараты для цитогенетических исследований готовили следующим образом. Клетки выдерживали с трипсином (0.25 %) на протяжении 10 мин при 37 °С. Далее их суспендировали и инкубировали 40 мин в растворе KCl (0.54 %) при 37 °С. Клетки фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1), трижды осаждая центрифугированием (по 10 мин при 1000 об/мин) и меняя фиксирующий раствор. Предметные стекла предварительно выдерживали в дистиллированной воде при -4 °С. Фиксированные клеточные суспензии наносили на холодные стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза. Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью бинокулярного микроскопа Carl Zeiss (Германия), используя объектив с увеличением 100×. Метафазные пластинки фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon (PowerShot G6, Great Britain). Частоты встречаемости клеток с ПКХ (рис. 1, а), митотических клеток (рис. 1, б), клеток с микроядрами (МЯ) (рис. 1, в), двуядерных клеток (ДК) (рис. 1, з), апоптотических (рис. 1, д) и клеток с различными ядерными аномалиями (рис 1, е—з) выражали в промиллях (%).

Определяли среднее значение показателя и его стандартное отклонение. Достоверность различий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Частота встречаемости разных цитогенетических характеристик, выраженная в промиллях (%), в эксперименте с краткосрочным культивированием клеток в присутствии ФНО и в контрольной популяции представлена в табл. 1. Для оценки пролиферативной активности клеток при воздействии ФНО анализировали стадии митоза.

Установили, что после культивирования клеток с ФНО в течение 1 ч не происходит цитогенетических изменений (табл. 1). Однако при анализе состояния хромосомного аппарата оказалось, что уже через 1 ч возрастает число метафаз с хромосомными aberrациями (хроматидными, хромосомными разрывами, фрагментами) до 20 % (против 4 % в контроле). Через 1 ч действия ФНО, при одинаковом с контролем митотическом индексе, заметно увеличивается доля клеток с ПКХ, т. е. появляются первые признаки митотической катастрофы, выражающиеся в задержке 41 % клеток на границе фаз G₂/M клеточного цикла (рис. 2, а).

Через 2 ч действия ФНО число клеток с ПКХ начинает уменьшаться, появляются клетки с измененной формой ядра (ядерными протрузиями), заметно увеличивается число метафаз при уменьшении числа анафазных и телофазных клеток (рис. 3). По данным литературы (Darzynkiewicz et al., 1984), ФНО не оказывает значительного влияния на клетки, находящиеся в фазе G₁ или S клеточного цикла, поэтому наблюдаемые нами изменения происходят в основном с клетками, которые в момент внесения препарата уже вступили в митоз.

Через 6 ч культивирование с ФНО приводит к накоплению апоптотических клеток, что проявляется в повышении уровня фрагментации ДНК хроматина во время электрофореза в агарозном геле (рис. 4). Разница между количеством метафазных клеток и клеток в других фазах митоза еще более выражена, а число клеток с ПКХ достигает минимального значения.

Таблица 1

Цитогенетические характеристики (в %) клеток линии U-937 в контроле (К) и после кратковременного действия ФНО

| Показатель | К, 1—2 ч | ФНО, 1 ч | ФНО, 2 ч | ФНО, 6 ч |
|------------------|------------|------------|------------------------|-------------------------|
| ПКХ | 7.3 ± 0.9 | 8.7 ± 0.5 | 6.3 ± 1.3 | 2.0 ± 0.8 ^а |
| Клетки с МЯ | 2.3 ± 0.4 | 2.0 ± 0.8 | 3.3 ± 0.5 | 5.3 ± 1.7 |
| МИ | 20.6 ± 1.2 | 20.7 ± 1.4 | 20.6 ± 0.5 | 21.3 ± 1.7 |
| АК | 17.7 ± 3.3 | 13.7 ± 1.3 | 19.7 ± 2.0 | 43.7 ± 3.7 ^а |
| ХЯ | 1.7 ± 0.4 | 1.0 ± 1.4 | 1.3 ± 0.5 | 1.3 ± 0.9 |
| Мосты | 0.3 ± 0.4 | 0 | 1.0 ± 0.8 | 0 |
| Протрузии | 8.7 ± 1.7 | 11.0 ± 2.5 | 13.3 ± 2.5 | 10.7 ± 0.9 |
| Клетки с ЯА и МЯ | 0.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 ^б | 1.0 |
| ДК | 2.3 ± 0.5 | 1.7 ± 1.3 | 2.0 ± 1.4 | 2.0 |
| Профаза | 2.7 ± 0.5 | 2.0 ± 0.8 | 2.7 ± 1.3 | 1.3 ± 0.9 |
| Метафаза | 7.3 ± 0.5 | 7.0 ± 0.82 | 9.30 ± 1.3 | 16.3 ± 0.8 ^а |
| Анафаза | 1.3 ± 0.5 | 1.0 ± 0.8 | 1.0 ± 0.8 | 0.7 ± 0.5 |
| Телофаза | 2.0 ± 1.4 | 2.0 | 1.3 ± 0.9 | 0.7 ± 0.5 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: ПКХ — клетки с преждевременной конденсацией хромосом, МЯ — микроядра, МИ — делящиеся клетки с учетом клеток с ПКХ, АК — апоптотические клетки, ХЯ — хвостатые ядра, мосты — межъядерные мосты, ЯА — аномалии ядра, ДК — двуядерные клетки. Различия с контролем достоверны при ^а *P* < 0.01 или ^б *P* < 0.05.

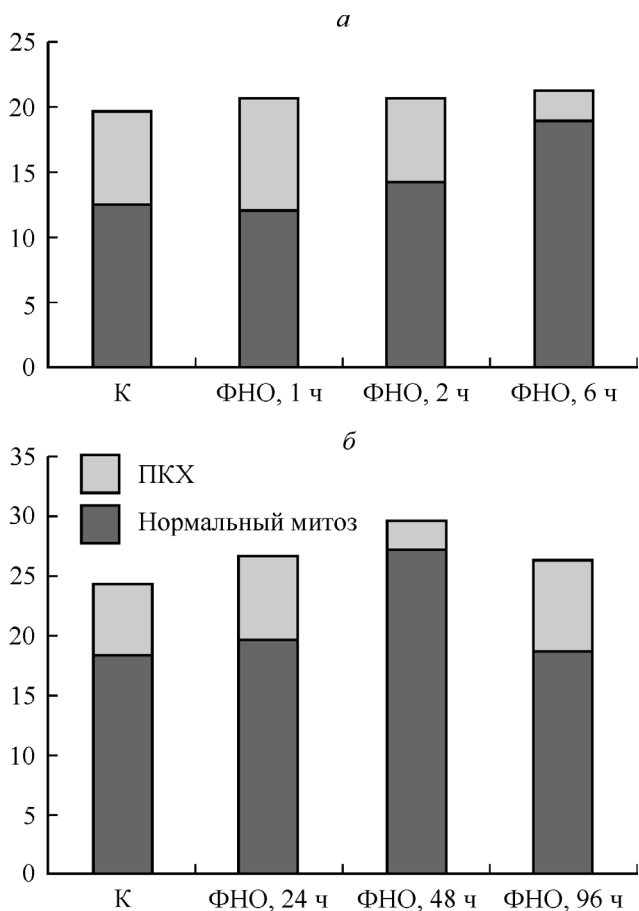


Рис. 2. Отношение числа клеток с ПКХ к общему числу делящихся клеток в эксперименте с кратковременным (а) и длительным (б) действием ФНО (в %).

В эксперименте с длительным действием ФНО митотический индекс через 24 ч несколько превышает значение в контроле, следовательно, клетки накапливаются в М-фазе, когда они наиболее чувствительны к действию ФНО (Darzynkiewicz et al., 1984). Через 24 ч культивирования с ФНО увеличивается доля клеток с МЯ, апоптотических клеток и клеток с ядерными протрузиями по сравнению с контролем. За это время клетки проходят полный клеточный цикл, и достоверное уменьшение числа анафаз свидетельствует о нарушении нормального хода деления. Еще через 48 ч культивирования токсическое действие ФНО становится более очевидным: резко возрастает частота клеток с МЯ, апоптотических клеток, клеток с комплексными нарушениями ядра и ДК. При этом число клеток с одиночными протрузиями меньше, чем в контроле. Можно предположить, что те клетки с ядерными аномалиями, которые накопились в течение первых 24 ч действия ФНО, погибли путем апоптоза, а новые только начали формироваться. В то же время накопление клеток на стадиях профазы и метафазы способствует усилению токсического действия ФНО.

Таким образом, через 96 ч культивирования с ФНО мы наблюдали увеличение частоты почти всех цитогенетических характеристик по сравнению с контролем: клеток с МЯ, разных вариантов ядерных аномалий (хвостатых ядер, $P < 0.05$), одиночных протрузий, комплексных аномалий, появление нуклосомных мостов (табл. 2.). Но несмотря на почти 5-кратное увеличение числа апоптоти-

ческих клеток по сравнению с контролем пролиферативная активность клеток достаточно высока. С одной стороны, часть клеток остается устойчивой к действию ФНО и продолжает дальнейшее деление, с другой — задержка клеток на стадии метафазы может приводить к высоким значениям митотического индекса. Задержку клеточного цикла можно проследить по отношению клеток с ПКХ к общему числу делящихся клеток, представленному на рис. 2, б. Достаточно высокий уровень клеточной пролиферации показывает циклическое изменение накопления клеток с ПКХ: число таких клеток увеличивается через 24 ч действия ФНО, уменьшается через 48 ч и вновь увеличивается через 96 ч.

В контрольной и обработанной ФНО популяциях клеток был проведен кариологический анализ, в результате которого установили, что в контрольной популяции клеток линии U-937 отчетливо выделяется модальный класс с числом хромосом 61—63, модальное число составляет 61 (17 % клеток), при этом клеточная популяция после действия ФНО в течение 96 ч модифицируется по увеличению числа метафаз с числом хромосом 62 (почти 50 %) и снижению клеток с числом хромосом больше и

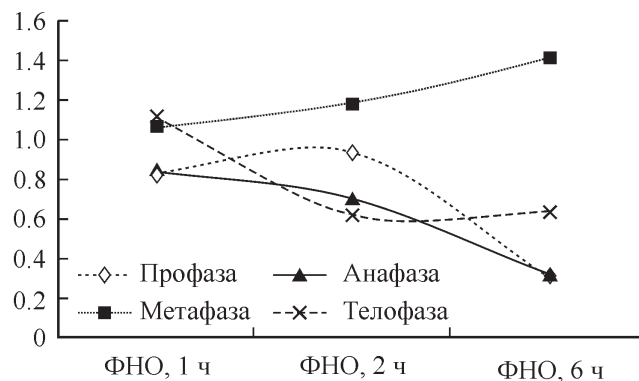


Рис. 3. Соотношение между числами клеток на стадиях митоза после действия ФНО и в контроле.

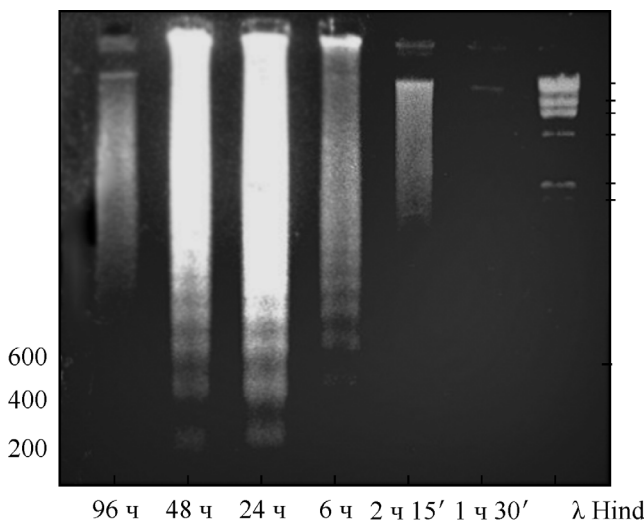


Рис. 4. Фрагментация ДНК клеток U-937 после действия ФНО в течение разного времени.

Электрофорез в агарозном геле. По вертикали — размер, тыс. пар нуклеотидов.

Цитогенетические характеристики (в %) клеток линии U-937 в контроле (К) и после длительного действия ФНО

| Показатель | К, 2 ч | ФНО, 2 ч | К, 24 ч | ФНО 24 ч | К, 48 ч | ФНО, 48 ч | К, 96 ч | ФНО, 96 ч |
|------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| ПКХ | 13.7 ± 1.7 | 1.3 ± 0.4 ^a | 4.3 ± 1.3 | 7.0 ± 0.8 | 2.3 ± 0.5 | 2.3 ± 0.5 | 3.7 ± 0.5 | 7.7 ± 1.3 ^b |
| МЯ | 3.7 ± 0.5 | 9.3 ± 0.5 ^a | 3.0 ± 0.8 | 11.3 ± 1.3 ^a | 2.3 ± 0.5 | 19.3 ± 2.9 ^a | 4.3 ± 1.3 | 7.7 ± 0.5 ^b |
| МИ | 37.5 ± 0.8 | 20.7 ± 2.5 | 28.0 ± 2.2 | 29.3 ± 1.7 | 15.3 ± 1.9 | 29.7 ± 1.7 ^a | 16.7 ± 2.5 | 26.0 ± 1.6 ^b |
| АК | 3.0 ± 0.8 | 6.3 ± 0.5 ^a | 2.0 ± 0.8 | 7.0 ± 0.8 ^a | 3.0 ± 0.8 | 31.0 ± 0.8 ^a | 15.0 ± 1.4 | 77.7 ± 9.4 ^a |
| ХЯ | 0.7 ± 0.5 | 3.3 ± 0.5 ^a | 1.7 ± 0.5 | 3.0 ± 0.8 | 2.0 ± 0.8 | 3.3 ± 0.5 | 2.0 ± 0.8 | 11.0 ± 3.3 ^b |
| Мосты | 0 | 1.0 | 0.3 ± 0.5 | 1.7 ± 0.9 | 0 | 0.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 | 6.3 ± 1.7 ^b |
| Протрузии | 8.3 ± 2.0 | 9.3 ± 0.5 | 8.7 ± 1.7 | 14.7 ± 1.3 ^b | 14.0 ± 0.8 | 10.0 ± 1.4 ^b | 5.7 ± 1.3 | 38.0 ± 4.0 ^a |
| Клетки с ЯА и МЯ | 0.3 ± 0.5 | 2.0 ± 0.8 | 0.7 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 | 1.0 ± 0.8 | 5.7 ± 1.3 ^b | 1.0 | 10.0 ± 2.2 ^a |
| ДЯ | 1.7 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 4.0 ± 0.8 ^a | 1.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 |
| Профаза | 5.3 ± 0.5 | 3.3 ± 1.3 | 2.7 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 | 4.7 ± 0.9 ^b | 3.3 ± 0.5 | 4.3 ± 1.3 |
| Метафаза | 14.7 ± 1.3 | 18.3 ± 1.3 ^b | 16.3 ± 1.3 | 15.7 ± 1.3 | 10.0 ± 0.8 | 18.7 ± 0.5 ^a | 7.7 ± 1.3 | 12.0 ± 1.6 ^b |
| Анафаза | 2.7 ± 0.5 | 4.7 ± 0.9 | 3.3 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 ^b | 1.0 ± 0.8 | 2.3 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 |
| Телофаза | 1.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 | 0.7 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 |

меньше моды, чем в контрольной популяции. Таким образом, сравнение распределения клеток по количеству хромосом в контрольных популяциях и после воздействия ФНО свидетельствует о том, что такое культивирование индуцирует процессы изменения состава клеточной популяции по соотношению клеток с разным числом хромосом, способствует исчезновению из популяции клеток с одним числом и делению клеток с другим числом хромосом.

Обсуждение

При сравнении результатов краткосрочного и длительного культивирования клеток в присутствии ФНО выявлено, что изменение частоты встречаемости различных цитогенетических аномалий в клеточных популяциях линии U-937 имеет нелинейный характер, в котором выделяются ранние эффекты (на протяжении первых 6 ч действия) и поздние (на протяжении нескольких суток).

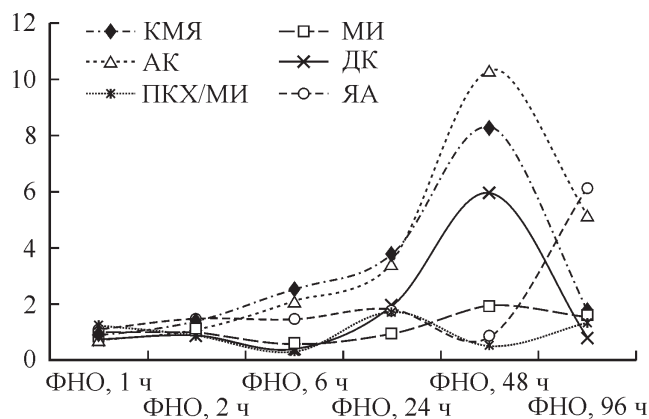


Рис. 5. Соотношение между числами клеток с разными морфологическими характеристиками после воздействия ФНО и в контроле.

КМЯ — клетки с микроядрами, МИ — делящиеся клетки с учетом клеток с ПКХ, АК — апоптотические клетки, ДК — двуядерные клетки, ПКХ/МИ — отношение клеток с ПКХ к общему числу делящихся, ЯА — суммарное количество клеток с ядерными аномалиями.

По данным литературы, первое проявление действия ФНО на клетки L-929 (NCTC, клон 929 (L)) — это их временная остановка в фазе G₂ клеточного цикла, при этом блокированные клетки проявляют признаки несбалансированного роста и характеризуются повышенным содержанием РНК. Несмотря на задержку, клетки вступают в митоз, а гибель части таких клеток происходит именно в конечной стадии митоза (телофаза) или вскоре после цитокинеза (Darzynkiewicz et al., 1984). Однако авторы предполагают, что ни ДНК, ни ядерные белки не являются основными мишенями действия ФНО, поскольку в выживших клетках нет изменений ядерного хроматина.

Задержку клеточного цикла отметили и мы уже через 1 ч воздействия ФНО по увеличению числа клеток с ПКХ; постепенно изменяется соотношение фаз клеточного цикла в сторону накопления метафаз, что увеличивает восприимчивость клеток к препарату (в это время появляются многочисленные хромосомные aberrации). По данным из литературы, синхронизация клеток линии U-937 в фазах G₂/M увеличивает их чувствительность к ФНО (Wang, 2003), а в клетках линии L-929 с низкой пролиферацией, наоборот, снижается чувствительность к ФНО (Ruff, Gifford, 1981).

По данным некоторых авторов, уже через 1—3 ч в клетках линий U-937 и Daudi ФНО активирует морфологические изменения, характерные для апоптоза, которые сопровождаются расщеплением ДНК размером в несколько нуклеосом, и эти события происходят за 1—2 ч до гибели клеток (Wright et al., 1992; Di Pietro et al., 1999). Накопление апоптотических клеток отметили и мы через 6 ч культивирования с ФНО (табл. 1). Часть клеток с ПКХ разрушается путем апоптоза, а другая предположительно минует точку проверки и продолжает нормальное деление (отсюда и снижение числа клеток с ПКХ) (рис. 2, а).

На рис. 5 представлено соотношение цитогенетических характеристик клеток после воздействия ФНО и контрольных. Через 24 ч культивирования с ФНО значительно увеличивается частота клеток с цитогенетическими нарушениями и их количество достигает пика через 48 ч. Существенно возрастает частота клеток с МЯ. Поскольку МЯ появляются вследствие кластогенных и анеугенных событий, их наличие свидетельствует об индук-

ции цитогенетической нестабильности. Повышение уровня клеток с МЯ в клетках Daudi после воздействия с ФНО связывают с изменениями в митохондриях и в организации микротрубочек на ранних стадиях, что приводит к усилению клеточной гибели (Di Pietro et al., 1999). В клетках меланомы человека линии STML-14 также было выявлено дозозависимое увеличение частоты клеток с МЯ в течение 72-часового действия ФНО (Zouboulis et al., 1990).

ФНО может вызвать повреждения ДНК через активные формы кислорода, что приводит к увеличению генных мутаций, амплификациям ДНК, к образованию МЯ и хромосомной нестабильности. Некоторые авторы сравнивают мутагенное действие ФНО с действием ионизирующего излучения. В этом случае ФНО приводит к злокачественной трансформации эмбриональных фибробластов мыши (Yan et al., 2006, 2009).

Характерной особенностью 96-часового культивирования клеток с ФНО является 6-кратное увеличение числа клеток с различными аномалиями формы ядра. Ядерные аномалии (ядерные почки, хвостатые ядра, нуклеоплазматические мосты, протрузии) могут указывать не только на дегенеративные процессы в клетках, в которых они наблюдаются, но и на факт предшествующих хромосомных aberrаций, в результате которых они сформировались. Например, нуклеоплазматические мосты происходят от дицентрических хромосом вследствие неуспешной репарации повреждений ДНК и также наблюдаются при дефектном расхождении сестринских хроматид в анафазе. Ядерные почки — результат устранения амплифицированной ДНК, возможных дополнительных хромосом из анеуплоидных клеток (Fenech et al., 2011), а также фрагментов ДНК, большей частью не имеющих центромерных и теломерных районов (Lindberg et al., 2007).

Одним из подтверждений дестабилизирующего влияния ФНО на клональную структуру клеточной линии U-937 могут быть некоторые результаты кариотипирования клеток, полученных после обработки ФНО. Так, в частности, в отдельных метафазных пластинках в долгосрочном эксперименте наблюдается присутствие мелких, нетипичных хромосом, в некоторых случаях по своей морфологии близких к описываемым как «двойные минутки» (double-minutes, или dmin). Присутствие таких хромосом не выявлялось ни в контрольных клетках, ни после краткосрочного действия цитокина в наших экспериментах. В то же время уже через 96 ч воздействия ФНО отчетливо выявляется изменение состава клеток с разным числом хромосом в сторону сужения модального класса и накопления клеток с числом хромосом 62, что на 1 хромосому больше модального числа в контроле. Можно предположить, что ФНО способствует селекции клеточных клонов с новыми свойствами, возможно устойчивых к действию этого фактора. По данным литературы, сублинии, полученные после культивирования клеток линии U-937 с ФНО, были устойчивы не только к ФНО, но и к некоторым химиотерапевтическим препаратам (Wright et al., 1992).

Таким образом, преждевременная конденсация хромосом является самым ранним показателем токсического действия ФНО, изменчивость этой характеристики имеет циклический характер. Через 2 ч действия на клетки U-937 ФНО начинает стимулировать апоптоз, приводит к накоплению клеток с МЯ и ядерными аномалиями. Максимальный эффект проявляется спустя два клеточных цикла (48 ч). Через 96 ч действия ФНО изменяется кле-

точный состав популяции, который характеризуется наличием клеток с разным числом хромосом. ФНО, вероятно, способствует селекции устойчивых к нему клеточных клонов и появлению сублиний с новыми свойствами по сравнению с исходной клеточной популяцией.

Работа выполнена в рамках бюджетной тематики Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины «Клеточный банк линий из тканей человека и животных», 2013 г.

Список литературы

- Semesiuk N. I., Zhylchuk A. V., Bezdenzhnykh H. O. *in*. 2012. Фактор некрозу пухлин у периферичній крові та кістковому мозку хворих на рак молочної залози як маркер прогресування пухлинного процесу. Онкологія. 14 (4) : 293—297. (Semesiuk N. I., Zhylchuk A. V., Bezdenzhnykh H. O., Lihova O. O., Zhylchuk V. E., Vorontsova A. L., Kudryavets Yu. I. 2012. Tumor necrosis factor in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients as a marker of the tumor progression. Oncology. 14 (4) : 293—297.)
- Altucci L., Rossin A., Hirsch O., Nebbioso A., Vitoux D., Wilhelm E., Guidez F., De Simone M., Schiavone E. M., Grimwade D., Zelent A., Hugues de The, Gronemeyer H. 2005. Reginoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. Cancer Res. 65 : 8754—8765.
- Darzynkiewicz Z., Williamson B., Carswell E. A., Lloyd J. Old. 1984. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. Cancer Res. 44 : 83—90.
- Di Pietro R., Robuffo I., Pucci A. M., Bosco D., Santavenere E. 1999. Effects of TNF-alpha/colchicine combined treatment on Burkitt lymphoma cells: molecular and ultrastructural changes. Cytokine. 11(2) : 144—150.
- Erenpreisa J., Cragg M. S. 2001. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. Cancer Cell Int. 1 : 1—7.
- Erenpreisa J., Kalejs M., Ianzini F., Kosmacek E. A., Mackey M. A., Emzish D., Cragg M. S., Ivanov A., Illidge T. M. 2005. Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. Cell Biol. Int. 29 : 1005—1011.
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T., Surrallés J., Crott J. W., Parry J., Norppa H., Eastmond D. A., Tucker J. D., Thomas P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis. 26 : 125—132.
- Ianzini F., Bertoldo A., Kosmacek E. A., Phillips S. L., Mackey M. A. 2006. Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. Cancer Cell Int. 6 : 11—18.
- Ianzini F., Mackey M. A. 1998. Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. Mutagenesis. 13 : 337—344.
- Kawamata Y., Imamura T., Babendure J. L., Juu-Chin Lu, Yoshizaki T., Olefsky J. M. 2007. Tumor necrosis factor receptor—1 (TNF-R1) can function through a Gαq/11 / β-arrestin-1 signaling complex. J. Biol. Chem. 282 : 28 549—28 556.
- Kovaleva O. A., Glazko T. T., Kochubey T. P., Lukash L. L., Kudryavets Yu. I. 2007. Spontaneous premature condensation of chromosomes in normal and transformed mammal cells. Exp. Oncol. 29 : 18—22.
- Lindberg H. K., Wang X., Jarventaus H., Falck G. C., Norppa H., Fenech M. 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. Mutat. Res. 617 : 33—45.
- Ruff M. R., Gifford G. E. 1981. Rabbit tumor necrosis factor: mechanism of action. Infect. Immunol. 37 : 380—385.
- Soranzo C., Perego P., Zunino F. 1990. Effect of tumor necrosis factor on human tumor cell lines sensitive and resistant to cyto-

toxic drugs, and its interaction with chemotherapeutic agents. *Anti-cancer Drugs*. 1 : 157—163.

Sundstrom C., Nilsson K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer*. 17 : 565—577.

Wang S., Wang Z., Dent P., Grant S. 2003. Induction of tumor necrosis factor by bryostatin 1 is involved in synergistic interactions with paclitaxel in human myeloid leukemia cells. *Blood*. 101(9) : 3648—3657.

Wright S. C., Kumar P., Tam A. W., Shen N., Varma M., Lar-rick J. W. 1992. Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J. Cell. Biochem*. 48 : 344—355.

Wright S. C., Tam A. W., Kumar P. 1992. Selection of tumor cell variants for resistance to tumor necrosis factor also induces a

form of pleiotropic drug resistance. *Cancer Immunol. Immunother.* 34 : 399—406.

Yan B., Peng Y., Li C. Y. 2009. Molecular analysis of genetic instability caused by chronic inflammation. *Methods Mol. Biol.* 512 : 15—28.

Yan B., Wang H., Rabbani Z. N., Zhao Y., Li W., Yuan Y., Li F., Dewhirst M. W., Li C. Y. 2006. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res.* 66 : 11 565—11 570.

Zouboulis C. C., Schroder K., Garbe C., Krasagakis K., Kruger S., Orfanos C. E. 1990. Cytostatic and cytotoxic effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on sensitive human melanoma cells *in vitro* may result in selection of cells with enhanced markers of malignancy. *J. Invest. Dermatol.* 95 (6) : 223S—230S.

Поступила 26 VII 2013

FEATURES OF CYTOGENETIC CHANGES IN THE HUMAN LYMPHOMA U-937 CELLS AFTER INDUCTION OF APOPTOSIS BY TUMOR NECROSIS FACTOR

O. A. Kovaleva, Ya. S. Yasinskiy, N. A. Bezdeneznykh, Yu. I. Kudryavets

R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kiev;
e-mail: strukov2002@mail.ru

A comparative analysis of the frequency of cytogenetic abnormalities in cell population U-937 in control conditions and after exposure to tumor necrosis factor has been performed. We have found that in such treatment there is a maximum effect after 48 h, which is expressed in the stimulation of apoptosis and the accumulation of cells with micronuclei and binuclear cells. The induction of premature chromosome condensation is an early marker of the TNF influence. Changing the composition of the population by the number of chromosomes in the cell may lead to the emergence of a subline with new properties compared to the parental cell population.

Key words: cell line U-937, TNF, cytogenetic abnormalities.