

## INTERFERON-ALPHA ENHANCES DEVELOPMENT OF APOPTOSIS INDUCED BY VARIOUS AGENTS IN TUMOR CELLS *IN VITRO*

Y.I. Kudryavets\*

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv 03022, Ukraine

## ІНТЕРФЕРОН-АЛЬФА ПОСИЛЮЄ РОЗВИТОК АПОПТОЗУ, ІНДУКОВАНОГО РІЗНИМИ ЧИННИКАМИ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ *IN VITRO*

Ю.І. Кудрявець\*

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології  
ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна

Interferon alpha (IFN) has been shown to increase *in vitro* cytotoxicity of anticancer agents, in particular tumor necrosis factor (TNF) and vinblastin (VBL), on tumor cell lines (U-937, K-562, HEp-2). This effect seems to be due to IFN ability to enhance apoptosis resulting in increasing number of apoptotic cells and increasing oligonucleosomal DNA fragmentation. TPA-induced differentiation of U-937 cells protects them from apoptosis induced by various agents (TNF, VBL). In contrast to U-937 cells, which require only 30 min of incubation with IFN for realization of its proapoptotic activity, increase of TNF cytotoxicity in K-562 and HEp-2 cells demands continuous presence of IFN in the medium. Such a phenomenon could provide the grounds for further analysis of IFN proapoptotic activity *in vivo*.

**Key Words:** apoptosis, cell lines, cytotoxic effect, interferon, malignant tumors, tumor necrosis factor.

Показано, що інтерферон-альфа (ІФН) посилює цитотоксичну дію протипухлинних агентів, зокрема фактора некрозу пухлин (ФНП) та вінбластину (ВБЛ), на клітини різних пухлинних ліній *in vitro* (U-937, K-562, HEp-2 та ін.). В основі цього ефекту лежить здатність ІФН посилювати апоптоз: в його присутності достовірно зростає кількість апоптичних клітин та посилюється олігонуклеосомальна фрагментація ядерної ДНК. Індукція диференціювання лейкозних клітин U-937 за допомогою ТРА захищає їх від апоптозу, індукованого різними чинниками (ФНП та ВБЛ). На відміну від клітин лінії U-937, у разі контакту яких з ІФН достатньо 30 хв для прояву його проапоптичної дії, в клітинах ліній K-562 та HEp-2 для підвищення цитотоксичності ФНП необхідна постійна присутність ІФН. Цей феномен розкриває нову грань у механізмі протипухлинної дії ІФН і є підставою для дослідження проапоптичної дії ІФН в умовах *in vivo*.

**Ключові слова:** апоптоз, вінбластин, злоякісні пухлини, клітинні лінії, інтерферон, фактор некрозу пухлин, цитотоксична дія.

ІФН належать до родини цитокінів, які індукують неспецифічну резистентність в клітинах до різних вірусів. Разом з тим, ці білки пригнічують проліферацію нормальних та пухлинних клітин, регулюють рівень їх диференціювання, а також модулюють *in vivo* активність різних компонентів імунної системи. Саме ці властивості ІФН привертають увагу онкологів [1, 19]. Результати експериментальних досліджень та клінічний досвід свідчать, що найбільш виражений протипухлинний ефект виявляють ІФН у комбінації з цитостатиками або з іншими цитокінами, в тому числі з ФНП [2, 17, 24], але механізми підвищення активності такої комбінації досі недостатньо вивчені.

Відомо, що ефективність протипухлинної терапії значною мірою визначається рівнем виникнення в

злоякісній пухлині так званої програмованої клітинної смерті, або апоптозу, який є фізіологічним процесом, спрямованим на знищення непотрібних або шкідливих для організму клітин, в тому числі пухлинних [20]. Останнім часом були отримані дані, що саме апоптоз лежить в основі стримування росту мікрометастазів за наявності онкологічного процесу [16, 27] і саме ця форма загибелі характерна для пухлинних клітин під час хіміотерапії [20]. Тому пошук препаратів, здатних посилювати апоптичну дію протипухлинних засобів або природних цитотоксичних факторів, є актуальною проблемою онкології.

Логічно припустити, що ІФН, як цитокін з широким спектром регуляторних функцій, може виступати і як індуктор чи модифікатор апоптозу [4]. Деякі дані свідчать, що ІФН, стимулюючи чи пригнічуючи апоптоз імунокомпетентних клітин, включаючи Т-клітини, макрофаги та еозинофільні гранулоцити, може виконувати функцію регулятора активності імунної системи [5, 13, 22]. Як прямий індуктор апоптозу пухлинних клітин ІФН діє лише в окремих випадках. Зокрема, він може індукувати апоптоз у

Received: July 20, 2001.

\*Correspondence: Fax: (044) 267-1656;

E-mail: kudrya@onconet.kiev.ua

Використані скорочення: ВБЛ – вінбластин; ІФН – інтерферон(и), ФНП – фактор некрозу пухлин; ХМЛ – хронічний мієлолейкоз; ЦТД – цитотоксична дія; РКР – длРНК-індукована протеїназа р68, ТРА – тетрадеканол форболімірестилат 13-ацетат.

T-клітинах лейкозної лінії Н-9, клітинах лімфоми Беркитта та гострої лімфобластної лейкемії [21, 25, 28].

Механізми проапоптичної активності ІФН остаточно не розкриті. Встановлено, що деякі з ІФН-індукованих білків, а саме ті, що забезпечують антивірусний стан (2',5'-олігоА-синтетаза, РНК-аза L, РKR – р68 протеїнкіназа), можуть брати участь і в індукції апоптозу вірусінфікованих клітин [11, 12]. Не виключено, що механізми проапоптичної дії цих та інших ІФН-індукованих білків в різних за походженням пухлинних клітинах можуть відрізнятися. Метою роботи було дослідження проапоптичної активності ІФН відносно пухлинних клітин різного тканинного походження, використовуючи як індуктори апоптозу ФНП та ВБЛ.

### МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проводили на клітинних лініях пухлин людини: U-937 (гістіоцитарна лімфома), K-562 (хронічний мієлолейкоз), HEp-2 (карцинома гортані) та Namalwa (лімфома Беркитта). Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з 2 ммоль/л L-глутаміну, 10% ембріональної сироватки теляти (Біомарк, Україна), 40 мкг/мл гентаміцину (Sigma, США) у зволоженої атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. В експериментах використовували рекомбінантний ІФН $\alpha$ 2b людини, отриманий з Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (специфічна активність  $2 \cdot 10^8$  од/мг білка). Препарат рекомбінантного ФНП-альфа людини (специфічна активність  $5 \cdot 10^7$  од/мг білка) був люб'язно наданий В.Г. Коробко (ІБОХ РАН, Росія). ВБЛ (Гедеон Ріхтер, Угорщина) використовували в концентраціях 5 і 50 нг/мл. Дослідження антипроліферативної, цитотоксичної та апоптичної дії препаратів проводили, як описано раніше [3]. Рівень апоптозу оцінювали за кількістю клітин з апоптичною морфологією та за кількістю характерних фрагментів, які утворювалися з розпадом ядерної ДНК [3].

Статистичну обробку матеріалів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень свідчать, що ІФН пригнічує проліферацію клітин всіх використаних ліній, але їх чутливість до антипроліферативної дії ІФН відносно низька: під впливом його в дозі  $10^3$  од/мл протягом 72 год пригнічення проліферації клітин не перевищує 15–28%. Зі підвищенням дози ІФН до  $10^4$  од/мл зростає і його антипроліферативна дія: більш чутливими за цих умов є клітини лінії U-937 — їх проліферація пригнічується на 35%, тоді як цей показник для клітин K-562, HEp-2 та Namalwa складає відповідно 19,8; 27,0 та 12,7%. Слід зазначити, що у всіх клітинних лініях сам ІФН не спричинює апоптоз, кількість загіблених клітин в культурах не перевищує 5–10%.

За чутливістю до цитотоксичної дії ФНП досліджувані клітини різко відрізняються: клітини лінії U-937 майже в 1000 разів більш чутливі, ніж кліти-

ни ліній K-562 та HEp-2 (рис. 1). Крім того, в клітинах U-937 ФНП швидко (за 2–4 год) індукує апоптоз, а в клітинах K-562 та HEp-2 апоптичні зміни та достовірну інгібіцію проліферації не відзначають навіть після 48 год інкубації з ФНП у дозі  $10^4$  од/мл. В культурі клітин Namalwa ФНП в дозі  $10^3$  од/мл стимулює проліферацію: кількість клітин в культурі за 96 год інкубації з цим фактором збільшується на 19% (див. рис. 1).

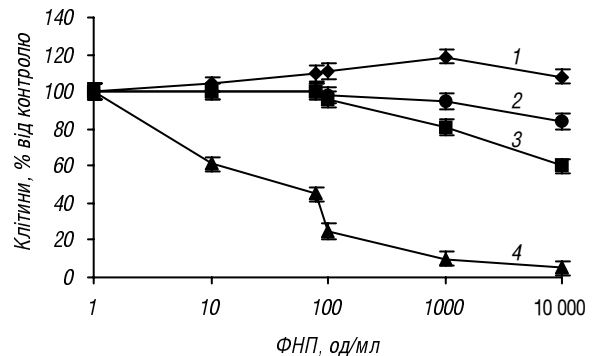


Рис. 1. Вплив ФНП на проліферацію клітин різних ліній людини *in vitro*: 1 – Namalwa; 2 – HEp-2; 3 – K-562; 4 – U-937

Дослідження цитотоксичної дії ФНП на клітини лінії U-937 у присутності ІФН протягом 24 год показало, що ІФН знижує ЦТД<sub>50</sub> ФНП з 64 од/мл до 8 од/мл (рис. 2). Морфологічний та молекулярно-біологічний аналіз клітин засвідчив, що підвищена токсичність ФНП в цьому випадку супроводжується саме збільшенням кількості апоптичних клітин. Посилювальна дія ІФН на розвиток ФНП-індукованого апоптозу особливо помітна при використанні низьких доз ФНП (рис. 3). Для більш глибокого вивчення механізмів впливу ІФН на апоптоз важливо було встановити, протягом якого часу відбувається активація та синтез фактора (ів), що посилюють апоптоз. З цією метою клітини U-937 культивували у присутності ІФН протягом 6, 24 або 48 год, після чого індукували апоптоз за допомогою ФНП, який додавали до культури клітин на 3–4 год. Встановлено, що ІФН значно стимулює апоптоз, якщо інку-

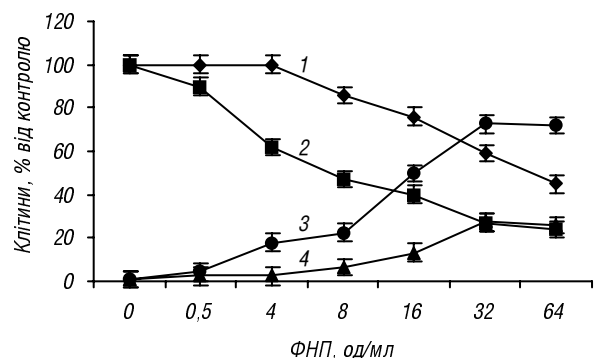
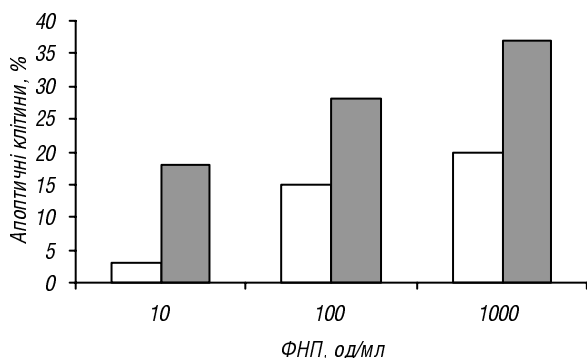


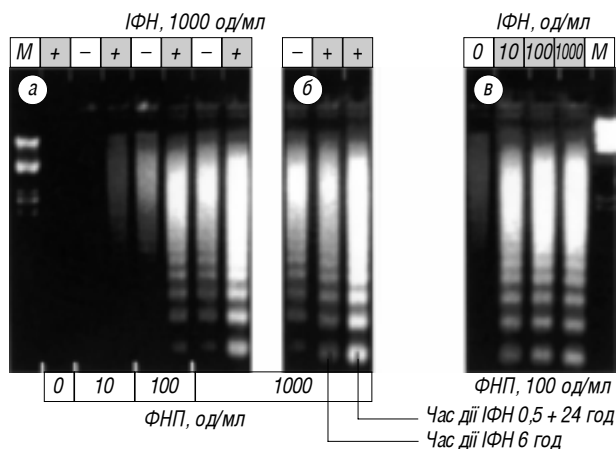
Рис. 2. Вплив ІФН на цитотоксичну активність ФНП в культурі клітин U-937.

Клітини інкубували з ІФН ( $10^3$  од/мл) протягом 24 год, а потім вводили ФНП в різних концентраціях на 24 год. Кількість живих та загіблених клітин підраховували шляхом застосування трипанового синього.  
1 – ФНП; 2 – ІФН + ФНП; 3 – ІФН + ФНП; 4 – ФНП. 1, 2 – живі клітини; 3, 4 – загіблі клітини



**Рис. 3.** Вплив ІФН на індукцію апоптозу в клітинах лінії U-937 шляхом застосування ФНП у різних дозах. □ — ФНП, ■ — ІФН (1000 од/мл) + ФНП

бація клітин в його присутності триває не менше 24 год. В умовах, коли індукцію апоптозу проводили через 6 год після внесення ІФН стимуляції апоптозу не відбувалося. В подальших експериментах до культури клітин лінії U-937 додавали ІФН на короткий час (від 30 хв до 4 год), після чого клітини відмивали від залишків ІФН та продовжували інкубування без нього. Через 20 год до культури клітин додавали ФНП на 3 год для індукції апоптозу і після цього реєстрували його рівень в контрольних та дослідних культурах. Встановлено, що достатньо 30 хв контакту пухлинних клітин з ІФН для зростання їх чутливості до індукції апоптозу (рис. 4).

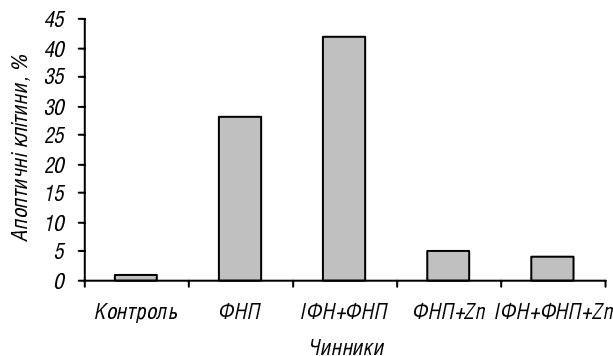


**Рис. 4.** Електрофорез ДНК клітин лінії U-937 після індукції в них апоптозу з застосуванням ІФН та ФНП у різних концентраціях (а) вплив ІФН (1000 од/мл) на індукцію апоптозу ФНП у різних його концентраціях; (б) вплив ІФН на індукцію апоптозу залежно від часу його дії; (в) вплив ІФН на апоптоз залежно від його концентрації в культурі

У дослідженнях дозової залежності впливу ІФН на апоптоз виявлено, що вже 10 од/мл ІФН посилюють апоптичну дію ФНП. Підвищення концентрації ІФН у середовищі не призводить до подальшого посилення апоптозу (див. рис. 4). Підвищення його рівня за допомогою ІФН чітко реєструється як за кількістю клітин з апоптичною морфологією, так і за рівнем специфічного розпаду ДНК на олігонуклеосомні фрагменти, які під час електрофорезу в агарозі формують так звану апоптичну драбину (див. рис. 4).

Нами встановлено, що в присутності іонів цинку, які додавали до культури клітин U-937 у вигляді

розчину ZnSO<sub>4</sub> в кінцевій концентрації 1 ммоль за 5–10 хв до внесення ФНП, індукція апоптозу повністю пригнічується як за морфологічною картиною, так і за розпадом хромосомної ДНК. ІФН в цих умовах не впливає на рівень індукції апоптозу в клітинах у присутності ZnSO<sub>4</sub> (рис. 5). Оскільки іони цинку пригнічують активність ендонуклеаз, які розщеплюють ДНК на ранніх етапах апоптозу, можна зробити висновок, що ІФН стимулює саме початкові етапи апоптозу.



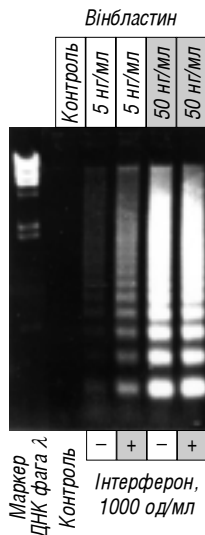
**Рис. 5.** Вплив іонів цинку на розвиток апоптозу в клітинах лінії U-937 у присутності ІФН

Антипроліферативна дія ІФН, як відомо, залежить від рівня диференціювання клітин, тому важливо було визначити його проапоптичний вплив на клітини в умовах їх диференціювання. Встановлено, що клітини лінії U-937 втрачають чутливість до апоптичної дії ФНП після індукції їх диференціювання за допомогою форболового ефіру ТРА (20 мкМ). ІФН не впливає на рівень апоптозу у культурі клітин U-937 у тому випадку, коли клітини піддаються диференціюванню в присутності ТРА. Слід відзначити, що повне пригнічення апоптозу відбувається вже через 1–3 год після внесення ТРА до культури клітин, коли з'являються лише перші ознаки диференціювання – зростання адгезії клітин до субстрату (дані не наведені).

Отримані результати свідчать, що ІФН значно посилює рівень індукції апоптозу під дією ФНП у клітинах монобластної лейкемії U-937. Динаміка формування під впливом ІФН стану підвищеної чутливості до індукції апоптозу значною мірою нагадує динаміку формування антивірусного стану: активація ІФН-індукованих генів, як відомо, проходить дуже швидко, однак синтез відповідних білків та виникнення в клітинах підвищеної готовності до апоптозу потребує додаткового часу (до 24 год). Звертає на себе увагу і відсутність прямої залежності рівня посилення апоптозу ІФН від його дози (принаймні в межах 10–10<sup>3</sup> од/мл). Саме в цих дозах ІФН достатньо для створення в клітинах міцного антивірусного стану. Це дозволяє припустити, що індуковані ІФН ферменти, а саме 2'-5'олігоА-синтетаза або р68-протеїнкіназа, які зумовлюють формування антивірусного стану в клітинах, можуть брати участь і у підвищенні їх чутливості до індукції апоптозу.

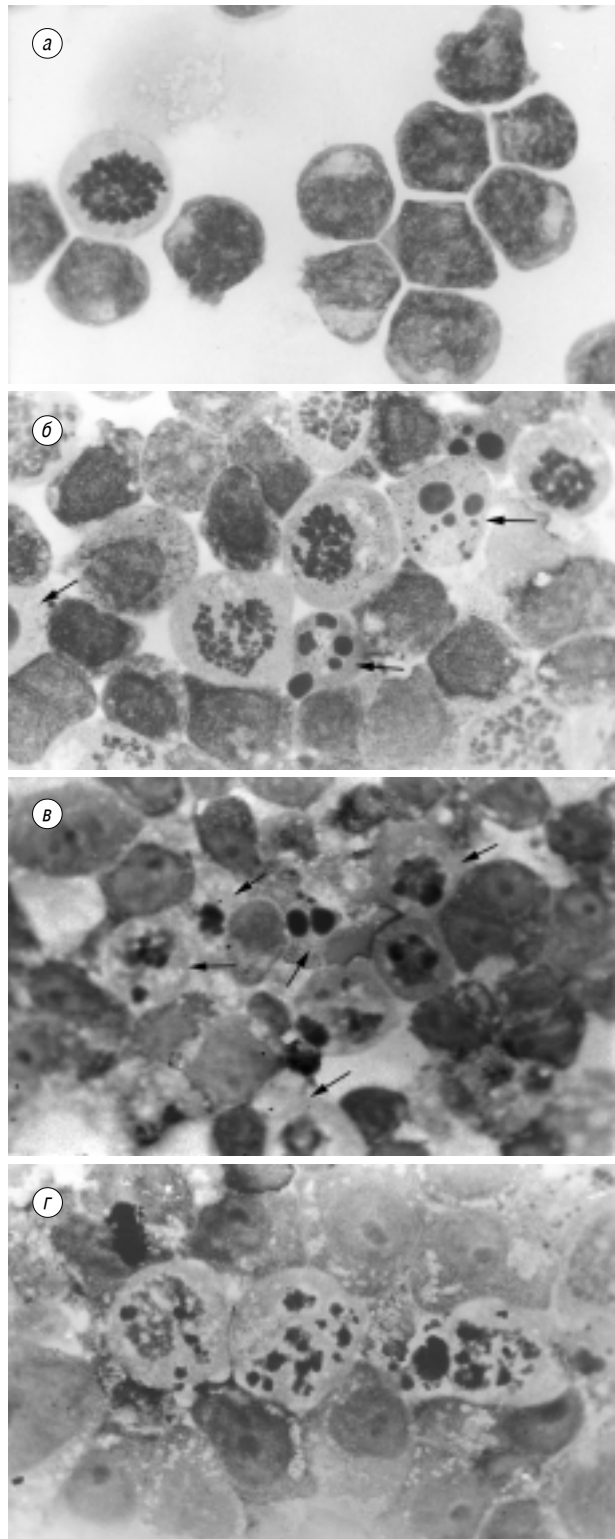
Цікаво було визначити проапоптичну активність ІФН в умовах використання інших цитотоксичних

факторів. З цією метою на клітини U-937 діяли ВБЛ у концентраціях 5 або 50 нг/мл протягом 16–19 год. Встановлено, що ця тубулінова отрута здатна індукувати у лейкозних клітинах класичний апоптоз подібно до дії ДНК-пошкоджувальних агентів: в культурах з ВБЛ відзначається велика кількість клітин з фрагментованим ядром, під час електрофорезу ДНК виявляється значний її розпад на типові олігонуклеосомальні фрагменти. Значне збільшення кількості фрагментованої ДНК в присутності ІФН особливо помітно у разі використання ВБЛ у невисокій концентрації (рис. 6). Характерним для апоптозу, індукованого ВБЛ у клітинах U-937, є значна кількість клітин з патологічними формами мітозу, серед яких типовими були відставання та розсіювання хромосом в метафазі, трьохгрупові метафази та багатополюсний мітоз. Такі патологічні форми мітозу характерні саме для пошкодження мітотичного апарату. Інкубація клітин одночасно з ІФН значно посилює загальну цитотоксичну дію ВБЛ, а також рівень індукції апоптозу: зростає кількість загиблих клітин та клітин з апоптичною морфологією, значно зростає фрагментація хромосомної ДНК (див. рис. 6). Під час аналізу картини мітозів у клітинах, що зазнають комбінованої дії ІФН та ВБЛ, відзначено, що в цьому випадку в патології мітозу домінує не стільки пошкодження мітотичного апарату клітин, скільки пошкодження хромосом, зокрема відбувається їх набухання та склеювання, що може бути додатковою ознакою пошкодження ДНК. З'являється значна кількість апоптичних клітин з нерівномірно конденсованим хроматином ядра (грудками) та конденсованою цитоплазмою (рис. 7). Важливим є той факт, що індукція диференціювання клітин за допомогою ТРА захищає їх від апоптозу, індукованого ВБЛ, але, як і у випадку з ФНП, ІФН не посилює апоптичну дію ВБЛ.



**Рис. 6.** Апоптичний розпад ДНК в клітинах лінії U-937 під дією ІФН та ВБЛ

Вплив ІФН на апоптичну дію ФНП у клітинах інших досліджуваних ліній (НЕР-2, К-562) суттєво відрізняється від описаного вище. По-перше, попередня інкубація клітин з ІФН протягом 24 год перед внесенням ФНП не є необхідною і не впливає на

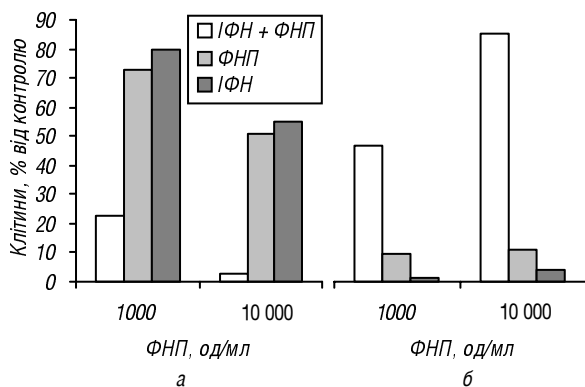


**Рис. 7.** Індукція апоптозу в клітинах лінії U-937 за допомогою ІФН та ВБЛ:

а – контроль; б – ВБЛ (50 нг/мл, 16 год); стрілкою зазначені апоптичні клітини з фрагментованим ядром; в – ІФН ( $10^3$  од/мл) + ВБЛ (50 нг/мл), 16 год; стрілкою зазначені апоптичні клітини з фрагментованим ядром та з нерівномірно конденсованим хроматином; г – ІФН + ВБЛ; типова картина пошкодження хромосом (набухання та склеювання) під дією ІФН та ВБЛ. Забарвлення за Папенгеймом.  $\times 1000$

рівень апоптозу чи цитотоксичності. Тільки постійна присутність обох цитокінів у культурі клітин супроводжується значним посиленням дії кожного з них. По-друге, помітний антипроліферативний ефект ІФН

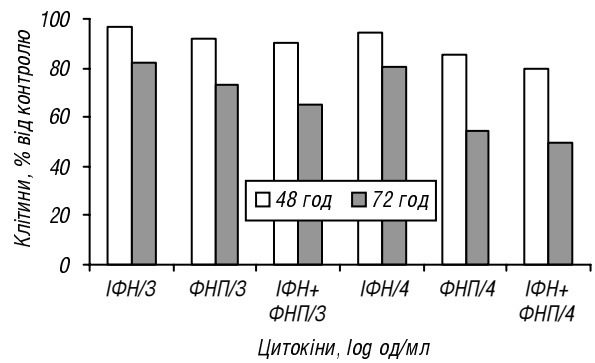
та ФНП реєструється лише через 48 год спільної дії цитокінів, але максимальний ефект відзначають через 72 год інкубації. Результати досліджень свідчать, що в клітинах лінії НЕР–2 лише ІФН достовірно пригнічує проліферацію у високих дозах (10<sup>4</sup> од/мл), але комбінована дія цих препаратів дає виражений синергічний цитотоксичний ефект і у разі застосування їх у нижчих дозах (рис. 8). В той же час, за даними морфологічного та молекулярно-біологічного аналізу клітин НЕР–2 встановлено, що ці цитокіни не спричинюють в них змін, типових для апоптозу в клітинах U–937: відсутній розпад ДНК на олігонуклеосомні фрагменти, не виявляються клітини з фрагментованим ядром, хоча кількість загиблих клітин в культурі (виявлених шляхом забарвлення трипановим синім) при комбінованій дії ІФН та ФНП (по 10<sup>4</sup> од/мл), досягає більше 90% (див. рис. 8). Отже, не виключено, що в пухлинних клітинах лінії НЕР–2, подібно до деяких інших епітеліальних клітин, апоптоз має нетиповий характер. За такого розвитку апоптозу виникають лише одно- та двониткові розриви ДНК без типової апоптичної морфології і загибель клітин відбувається за механізмом некрозу. До речі, виявлено [17], що використання ІФН та ФНП у комбінації з протипухлинним препаратом флуороурацилом зумовлює саме збільшення кількості розривів хромосомної ДНК в клітинах раку кишечника у людини.



**Рис. 8.** Цитотоксична дія ІФН та ФНП в культурі клітин НЕР–2. а — живі клітини, б — мертві клітини

В клітинах лінії К–562 ІФН та ФНП більш помітно пригнічують проліферацію, ніж в клітинах НЕР–2, але їх комбінація дає менш ніж адитивний цитотоксичний ефект. Складається враження, що домінуючу роль в цьому відіграє ФНП (рис. 9). Разом з тим, встановлено, що сам ФНП в цих умовах спричинює типовий апоптоз лише в 7 ± 0,5% клітин, але при комбінованій дії ФНП та ІФН кількість апоптичних клітин зростає до 21,0 ± 2,0% (P < 0,001). Наведені дані дають підстави вважати, що в клітинах лінії К–562 при довготривалій обробці ІФН посилює індукцію саме апоптозу. Така властивість ІФН може частково пояснювати його високу протипухлинну активність при лікуванні хворих на ХМЛ [26].

У клітинах лінії Namalva можна спостерігати ще один варіант комбінованої дії ІФН та ФНП. В цих лімфобластоїдних клітинах ФНП (10<sup>3</sup> од/мл) підви-



**Рис. 9.** Вплив ІФН, ФНП або їх комбінації на проліферацію клітин лінії К–562

щує проліферативну активність, внаслідок чого кількість клітин за 96 год інкубації з ним збільшується на 19%, але при одночасній дії ФНП та ІФН (10<sup>3</sup> од/мл) останній блокує рістстимулювальний ефект ФНП і пригнічує ділення клітин на 31,7%. В цій культурі клітин протягом 96 год не відмічається цитотоксичної дії ФНП, ІФН або їх комбінації.

Отже, результати експериментів свідчать, що причини підвищення протипухлинної цитотоксичності різних чинників у присутності ІФН та ефективності протипухлинної терапії з використанням ІФН можуть критися в тому, що для пухлинних клітин ІФН виконує роль не тільки негативного фактора росту, а й стимулятора апоптозу: у комбінації з природним індуктором апоптозу ФНП або в комбінації з класичним цитостатиком ВБЛ він значно підвищує їх протипухлинну ефективність. Логічно припускати, що виявлені нами нові властивості ІФН мають значення для підвищення ефективності хіміотерапії саме в результаті підвищення рівня апоптозу в злоякісній пухлині. Слід підкреслити, що в плані клінічного використання ІФН встановлений нами факт взаємодії ІФН з ФНП важливий ще й тому, що в крові багатьох хворих онкологічного профілю циркулює ендогенний ФНП [8, 23], апоптична дія якого на пухлинні клітини може бути значно посилена шляхом проведення ІФН-терапії. Кінетика та характер дії ІФН залежать від типу пухлинних клітин та їх чутливості до індуктора апоптозу. За її відсутності, чи то з природних причин, чи внаслідок індукції диференціювання, ІФН самостійно не індуктує апоптоз, але зберігає антипроліферативну активність.

Відомо, що внаслідок взаємодії ІФН із специфічними рецепторами на поверхні клітин в них індукується синтез принаймні 30 білків, серед яких є й ті, що забезпечують його антивірусну та антипроліферативну дію [19]. Незважаючи на інтенсивні дослідження в цій галузі конкретна послідовність біохімічних подій, які призводять до різних ефектів ІФН (антивірусного, антипроліферативного, апоптичного та ін.), поки що недостатньо вивчені. Важливо підкреслити, що більшість ІФН-індукованих генів належать до категорії так званих генів-супресорів, тобто генів з протираковою активністю. Встановлено, що деякі з цих білків, а саме ті, що забезпечують створення антивірусного стану (2–5–Ас,

РНК-аза L, PKR), можуть брати участь і в індукції апоптозу [11, 12]. Не виключено, що механізми апоптичної дії цих білків у різних за походженням пухлинних клітинах можуть розрізнятися. Умовно ці механізми можна поділити на прямі та непрямі. В одних випадках це може бути безпосередня участь ІФН-індукованих білків у посиленні дії того чи іншого його індуктора, в інших – ці білки можуть вибірково пригнічувати синтез або нейтралізувати в іншій спосіб дію факторів, що захищають клітину від апоптозу. Для реалізації цього непрямого шляху необхідний спочатку синтез ІФН-індукованих білків, а вже потім за їх участі відбувається пригнічення синтезу інгібіторів апоптозу та виснаження їх передіснуючих клітинних запасів. Очевидно, що згаданий непрямий шлях модуляції апоптозу за часом реалізації буде значно довшим, ніж перший прямий шлях. В наших дослідженнях характер виникнення стану підвищеної чутливості клітин лінії U-937 до апоптозу, індукованого ФНП або ВБЛ, відповідає прямому, більш швидкому шляху участі ІФН у модуляції апоптозу. В інших лініях клітин явно реалізуються непрямі механізми дії ІФН на розвиток апоптозу, оскільки вони потребують для максимального ефекту більш тривалого часу. Результати наших досліджень, які можуть свідчити про важливу роль PKR в індукції апоптозу в клітинах U-937, знаходять підтвердження в роботі Yeung та співавторів [29], де зазначено, що клітини, які експресують PKR-антисенс послідовності, стають резистентними до ФНП-індукованого апоптозу. За даними цих авторів, генералізований розпад клітинної ДНК під час апоптозу в клітинах U-937 здійснюється з участю саме PKR. Такі властивості цього елемента клітинної системи ІФН дозволили авторам вважати PKR кандидатом у "гени смерті" (death gene).

Опубліковано достатньо даних, які свідчать про можливість активації ІФН інших медіаторів апоптозу, таких, як каспази-3, 7, 8, а також інгібітор циклінзалежних кіназ p27Kip1 [9, 15, 28].

Стосовно питання про роль ІФН-індукованих білків в апоптозі доцільно також згадати експерименти з факторозалежними клітинними лініями, за результатами яких під час вилучення конкретного фактора росту швидко пригнічується білковий синтез та виникає апоптоз. Виявилось, що в IL-3-залежних клітинах лінії NFS/N1.H7 видалення із середовища IL-3 призводить до аутофосфорилування ІФН-індуцибельної PKR, яка в свою чергу фосфорилує альфа-субодиницю еукаріотичного фактора ініціації білкового синтезу (eIF-2a), що супроводжується пригніченням білкового синтезу і наступним апоптозом. З додаванням IL-3 до культури клітин відбувається швидке дефосфорилування PKR та eIF-2a і відновлення білкового синтезу [18]. Цей цікавий факт свідчить, що фізіологічна регуляція проліферації кровотворних клітин факторами росту може здійснюватись через білки клітинної системи ІФН, які досі розглядалися тільки як система антивірусного захисту.

Нарешті, можливі й інші непрямі шляхи посилення апоптозу ІФН, в тому числі пригнічення ним експресії рецепторів факторів росту, що лишає клітини трофічної стимуляції, необхідної для захисту від апоптозу, а також стимуляція експресії факторів, призначених для виконання ендogenous апоптозу, або їх рецепторів, наприклад FAS-антигену чи FAS-ліганду. Деякі факти свідчать, що останній шлях індукції апоптозу відіграє головну роль у протипухлинній дії ІФН під час успішної терапії раку шкіри [10]. Цей ефект ІФН має місце і в випадку мієломної хвороби і ХМЛ [14, 26].

Одним із механізмів посилення токсичності ФНП (або апоптозу) ІФН може бути посилення останнім експресії рецепторів ФНП. Дійсно, встановлено, що ІФН (альфа, бета та гамма) можуть збільшувати зв'язування ФНП з його рецептором (ФНП-Р), але цей ефект ІФН не є головним механізмом посилення токсичності ФНП, оскільки, по-перше, ефект посилення виникає і в тих випадках, коли експресія ФНП-Р не збільшується, і по-друге, час життя ФНП-Р лише 2 год і після їх активації ІФН рівень їх експресії через 24 год знижується до 40% [6]. Крім того, рівень експресії ФНП-Р на пухлинних клітинах, як відомо, ще не відображає рівень токсичності для них ФНП, але модуляція їх експресії супроводжується модуляцією і цитотоксичності ФНП. Отже, в деяких клітинах (подібних до HEp-2 або K-562) підвищення токсичності ФНП за допомогою ІФН теоретично може бути пов'язане зі збільшенням експресії ФНП-Р. Можливо саме тому в цих культурах клітин для підтримки підвищеного рівня експресії ФНП-Р необхідна постійна присутність обох цитокінів, але ці припущення потребують детальної перевірки, оскільки існують дані, що в деяких випадках ІФН може і пригнічувати експресію ФНП-Р [7].

## ПОДЯКА

Автор висловлює подяку І.В. Несіній за допомогу у дослідженні патології мітозу в цитопрепаратах пухлинних клітин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. **Воронцова АЛ, Кудрявец ЮИ.** Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных. Онкология 2000; 2: 16–24.
2. **Коровін СІ, Жильчук ВС, Ткачук ТЄ, Воронцова АЛ, Толстоп'ятов БО.** З досвіду застосування вітчизняного рекомбінантного  $\alpha$ -2b-інтерферону – лаферону в онкологічній клініці. Фармац журн 1998; (1): 66–70.
3. **Кудрявец ЮИ, Фильченков АА, Абраменко ИВ, Полищук ЛЗ, Слуквин ИИ, Белоус НИ.** Динамика апоптических событий, индуцированных фактором некроза опухолей в лейкозных клетках U-937. Эксперим онкол 1996; 18: 353–65.
4. **Кудрявец ЮИ, Воронцова АЛ.** К стратегии использования интерферона в антиметастатической терапии: усиление лафероном индукции апоптоза в опухолевых клетках. В: Лаферон в лікуванні онкологічних та інфекційних захворювань. Рівне: Волинські литаври, 1996: 10–21.
5. **Adler B, Adler H, Jungi TW, Peterhans E.** Interferon-alpha primes macrophages for lipopolysaccharide-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1995; 215: 921–7.

6. **Aggarwal BB, Eessalu TE.** Induction of receptors for tumor necrosis factor  $\alpha$  by interferons is not a major mechanism for their synergistic cytotoxic response. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10000–7.
7. **Aggarwal BB, Pandita R.** Both type I and type II interferons down-regulate human tumor necrosis factor receptors in human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Role of protein kinase C. *FEBS Lett* 1994; **337**: 99–102.
8. **Aguilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio LM, Santiago AD, Mellstedt H, Jondal M.** Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med Oncol* 1999; **16**: 289–95.
9. **Balachandran S, Roberts PC, Kipperman T, Bhalla KN, Compans RW, Archer DR, Barber GN.** Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* 2000; **74**: 1513–23.
10. **Buechner SA, Wernli M, Harr T, Hahn S, Itin P, Erb P.** Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2691–6.
11. **Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Ame-miya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ.** A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med* 1997; **186**: 967–72.
12. **Clemens MJ, Elia A.** The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 1997; **17**: 503–24.
13. **Dao T, Ariyasu T, Holan V, Minovada J.** Natural human interferon-alpha augments apoptosis in activated T cell line. *Cell Immunol* 1994; **155**: 304–11.
14. **Egle A, Villunger A, Kos M, Bock G, Gruber J, Auer B, Greil R.** Modulation of Apo-1/Fas (CD95)-induced programmed cell death in myeloma cells by interferon-alpha 2. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 3119–26.
15. **Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M.** Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2881–90.
16. **Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J.** Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; **1**: 149–53.
17. **Ismail A, Van Groeningen CJ, Hardcastle A, Ren Q, Aherne GW, Geoffroy F, Allegra CJ, Grem JL.** Modulation of fluorouracil cytotoxicity by interferon-alpha and -gamma. *Mol Pharmacol* 1998; **53**: 252–61.
18. **Ito T, Jagus R, May WS.** Interleukin 3 stimulates protein synthesis by regulating double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7455–9.
19. **Johnson HM, Bazer FW, Szente BE, Jarpe MA.** How interferons fight disease. *Sci Am* 1994; (5): 40–7.
20. **Kerr FR, Winterford CM, Harmon BV.** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; **73**: 2013–26.
21. **Manabe A, Yi T, Kumagai M, Campana D.** Use of stroma-supported cultures of leukemic cells to assess anti-leukemic drugs. I. Cytotoxicity of interferon alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993; **7**: 1990–5.
22. **Morita M, Lamkhieoued B, Soussi Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Capron A, Capron M.** Induction by interferons of human eosinophil apoptosis and regulation by interleukin-3, granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-5. *Eur Cytokine Netw* 1996; **7**: 725–32.
23. **Naylor MS, Stamp GWH, Balkwill FR.** Investigation of cytokine gene expression in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1990; **50**: 4436–40.
24. **Ozzello L, de Rosa CM, Cantell K, Kauppinen HL, Habif DV.** Regression of human breast cancer xenografts in response to intralesional treatment with interferons alpha and gamma potentiated by tumor necrosis factor. *J Interferon Cytokine Res* 1995; **15**: 839–48.
25. **Sangfelt O, Erickson S, Castro J, Heiden T, Einhorn S, Grander D.** Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 343–52.
26. **Selleri C, Sato T, Del Vecchio L, Luciano L, Barrett AJ, Rotoli B, Young NS, Maciejewski JP.** Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1997; **89**: 957–64.
27. **Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, Al-Mehdi AB, Bernhard EJ, Muschel RJ.** Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001; **61**: 333–8.
28. **Yanase N, Ohshima K, Ikegami H, Mizuguchi J.** Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax-alpha cleavage during IFN-alpha-induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 1121–9.
29. **Yeung MC, Liu J, Lau AS.** An essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in the tumor necrosis factor-induced apoptosis in U937 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12451–5.