

На правах рукописи

ШИРОКОВА

Анна Вячеславовна

**ИЗМЕНЕНИЕ ВОДНОГО И ИОННОГО
БАЛАНСА КЛЕТОК U937 ПРИ АПОПТОЗЕ, ВЫЗВАННОМ
ЭТОПОЗИДОМ И СТАУРОСПОРИНОМ**

03.00.25

Гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2008

Работа выполнена в Институте цитологии РАН,
Санкт-Петербург

Научный руководитель: доктор биологических наук
Веренинов Алексей Андреевич
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Марахова Ирина Ильинична
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Савина Маргарита Васильевна
Институт эволюционной физиологии и биохимии
имени И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Ведущая организация: Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербургского государственного
университета

Защита состоится 28 ноября 2008 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан 23 октября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Апоптоз – программируемая гибель клеток, естественный процесс, предназначенный для элиминации поврежденных клеток, либо клеток, “не нужных” по программе индивидуального развития организма. Неспособность клеток подвергаться апоптозу одна из причин развития злокачественных опухолей. Апоптоз может быть вызван как эндогенными, так и экзогенными факторами и отличается от некроза по ряду признаков. Важнейшим из них в функциональном плане является отсутствие воспалительной реакции соседних клеток на продукты распада благодаря длительному сохранению целостности плазматической мембраны. Характерные признаки апоптоза: утрата межклеточных контактов, блеббинг, дегидратационное сжатие клеток, разрушение цитоскелета, конденсация хроматина, фрагментация ядер, деграция ДНК (Häcker, 2000; Bortner, Cidlowski, 2002; Elmore, 2007).

Сокращение объема клеток исторически рассматривалось как главный признак апоптоза, отличающий его от некроза (Kerr, 1971). Заключение об уменьшении объема клеток ранее делали на основании микроскопии фиксированных гистологических препаратов. В настоящее время апоптоз изучают во многих случаях на живых клетках, и вывод о сокращении размеров клеток обычно основан на измерениях малоуглового светорассеяния при проточной цитометрии, хотя этот метод нельзя считать строгим (Shapiro, 1988). Апоптотное уменьшение объема клеток (Apoptotic Volume Decrease, AVD) связывают с их дегидратацией (Okada et al., 2001; Ernest et al., 2008). Интерес к исследованию роли моновалентных ионов в апоптозе в последние годы не ослабевает (Lang et al., 2005; 2006; 2007; 2008; Akimova et al., 2008; Numata et al., 2008). Широко распространено представление, что выход внутриклеточного K^+ является важным процессом, сопровождающим, а по мнению многих исследователей и обуславливающим AVD (Bortner, Cidlowski, 2002; Park, Kim, 2002; Yu, 2003a; Bortner et al., 2008). Ряд исследователей считает, что изменение внутриклеточной концентрации K^+ при апоптозе изменяет состояние каспаз и нуклеаз (Hughes et al., 1997; Hughes, Cidlowski, 1999). Тем не менее, работ, в которых ионный и водный баланс клеток при апоптозе измеряли бы параллельно, мало, и остается неясным, как изменение содержания K^+ в клетках соотносится с изменением содержания внутриклеточной воды и, соответственно, с изменением концентрации K^+ во внутриклеточной воде. Представлялось актуальным исследовать этот вопрос, используя наиболее чувствительный в настоящее время метод определения внутриклеточного содержания воды путем измерения плавучей плотности клеток в градиенте Перколла и технику эксперимента, позволяющую анализировать содержание ионов в отдельных плотностных фракциях. Такой подход ранее не применялся.

Актуальным представлялось также исследование изменений баланса моновалентных ионов при апоптозе, не сопровождающемся дегидратацией, то есть таком, который наблюдается у клеток U937, при действии этопозидов. Предполагалось, что изучение изменений ионного баланса, не связанных с нарушением водного баланса, даст более широкую картину участия в апоптозе основных систем переноса моновалентных ионов через клеточную мембрану.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы - сравнительное исследование изменения ионного и водного баланса клеток U937 при апоптозе, вызванном стауроспорином, когда по предварительным наблюдениям имеет место дегидратация клеток, и при апоптозе, вызванном этопозидом, когда водный баланс не изменяется. В связи с поставленной целью необходимо было провести следующие исследования:

1. Путем измерения плавучей плотности клеток U937 определить наличие или отсутствие дегидратации при апоптозе, вызванном стауроспорином и этопозидом.
2. С помощью эмиссионного и радиоизотопного анализа определить внутриклеточное содержание K^+ , Na^+ и Cl^- и измерить потоки Rb^+ через клеточную мембрану клеток U937 при апоптозе, вызванном стауроспорином и этопозидом.
3. Для диагностики апоптоза провести проточную цитометрию и флуоресцентную микроскопию клеток.

Научная новизна работы. Впервые показано, что вызванный этопозидом апоптоз клеток U937 не сопровождается дегидратацией и уменьшением объема клеток. Впервые показано, что и при отсутствии апоптозной дегидратации в клетках имеют место ионные изменения – снижение соотношения содержания внутриклеточных катионов K^+ и Na^+ и изменение потоков $Rb^+(K^+)$ через плазматическую мембрану. В случае апоптоза, вызванного этопозидом, изменения ионного баланса обусловлены как снижением направленного в клетку потока калия через Na^+/K^+ насос, так и нарастанием потока калия из клетки вследствие увеличения интегральной проницаемости калиевых каналов. Впервые показано, что при апоптозе, вызванном стауроспорином, дегидратация клеток и изменение ионного баланса в зависимости от глубины апоптоза и клеточной сублинии могут быть связаны преимущественно с уменьшением потока катионов через Na^+/K^+ насос, как это происходит у клеток U937-N9957, но могут быть связаны и с увеличением убаин-резистентного потока $Rb^+(K^+)$ (потока через каналы) без существенного изменения потока через насос, как это имеет место у клеток U937-160B2. Благодаря одновременному определению содержания в клетках воды, K^+ , Na^+ и Cl^- впервые на примере апоптоза клеток U937, вызванного стауроспорином, строго показано, что апоптозная дегидратация клеток определяется главным образом (на 2/3) снижением

внутриклеточного содержания K^+ и Cl^- , и что концентрации K^+ во внутриклеточной воде при этом изменяется незначительно.

Теоретическая и практическая значимость. Апоптоз играет весьма важную роль в антиканцерогенезе. Нарушение нормального протекания апоптоза вследствие нарушения ионной регуляции клеточного объема может быть одной из причин развития опухолей. Изучение перестроек в этом аппарате при апоптозе имеет важное практическое значение. На это указывает большое количество работ, посвященных изучению ионных процессов при апоптозе.

Основные положения, выносимые на защиту:

Дегидратация клеток не является обязательным признаком апоптоза. При апоптозе с дегидратацией она обусловлена главным образом снижением внутриклеточного содержания K^+ и Cl^- . Концентрация K^+ во внутриклеточной воде при этом изменяется незначительно. Апоптоз без дегидратации сопровождается изменением соотношения в клетке K^+ и Na^+ без изменения суммарного внутриклеточного содержания этих катионов. Изменения ионного и водного баланса при апоптозе в зависимости от глубины апоптоза и особенностей клеток обусловлены в одних случаях преимущественно изменением активности Na^+/K^+ насоса, а в других - изменением состояния K^+ каналов либо комбинацией этих изменений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на I и II Всероссийских съездах Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003, 2006) и на научных семинарах Лаборатории физиологии клетки Института цитологии РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 9 работ (6 статей).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 80 страницах и включает 14 рисунков и 8 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Исследование проводили на двух сублиниях культуры клеток гистиоцитарной лимфомы U937 (U937-160B2 и U937-9957), полученных из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Контрольные и опытные препараты инкубировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C в течение 4-5 ч при концентрации клеток 0.7 - 1 млн/мл в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки (FBS HyClone Standard).

Индукция апоптоза. При индукции апоптоза среда содержала 0.2÷1 мкМ стауроспорин (Sigma) или 50 мкМ этопозид (Sigma). Концентрированные растворы стауроспорина (2мМ) и этопозид (34 мМ) готовили на DMSO. Конечная концентрация DMSO составляла 0.1-0.5 %.

Определение внутриклеточного содержания воды по плавучей плотности клеток.

Определение плавучей плотности клеток проводили в непрерывном градиенте Перколла (Pharmacia). Раствор Перколла готовили путем разбавления исходного препарата средой RPMI до концентрации 35-40 %. Для создания изоосмотической среды к раствору Перколла добавляли 10-кратный концентрат среды Хенкса. Формирование градиента плотности проводили центрифугированием полученного раствора в пробирках 90×8 мм в течение 40 мин при 2000 g в угловом роторе центрифуги К-23 (Janetzki, ГДР). Плотность контролировали маркерами 1.033, 1.049, 1.062 г/мл (Sigma). Содержание в клетке воды на 1 г белка (v) находили по формуле: $v = (1 - \rho / \rho_{\text{dry}}) / [0.65(\rho - 1)]$, где ρ - измеренная плавучая плотность клетки. В расчетах принимали, что плотность сухой массы $\rho_{\text{dry}} = 1.35$ г/мл и что белок составляет 79 % сухой массы. Сконцентрированную суспензию клеток объемом 100 мкл (3-5 млн. клеток) наслаивали на поверхность раствора Перколла и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g в бакет-роторе центрифуги MPW-340 (Польша). Фракции отбирали шприцем и после разбавления средой RPMI в 4-6 раз центрифугировали 5 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в среде RPMI и использовали для определения ионного состава, микроскопирования и проточной цитометрии.

Определение внутриклеточного содержания K^+ , Na^+ и Rb^+ . Клетки после осаждения центрифугированием 5 раз промывали раствором $MgCl_2$ (96 мМ) без ресуспендирования. Отмытый осадок заливали 1 мл 5 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Концентрацию катионов в супернатанте определяли эмиссионным анализом в воздушно-пропановом пламени на атомно-абсорбционном спектрофотометре Perkin-Elmer AA-306. В качестве калибровочных растворов использовали растворы KCl , $NaCl$ (10÷100 мкМ) и $RbCl$ (5÷10 мкМ), приготовленные на 5 %-ной трихлоруксусной кислоте. Содержание ионов в клетке рассчитывали в миллимолях на 1 г белка. Количество белка в осадке определяли по Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Измерение убаин-чувствительного и убаин-резистентного входного потока Rb^+ . Исходный 50 мМ раствор $RbCl$ добавляли к 1 мл клеточной суспензии ($\approx 1 \cdot 10^6$ клеток) до получения концентрации 2.5 мМ. Инкубация клеток с Rb^+ длилась 10 мин в среде без убаина или с убаином в концентрации 0.1 мМ (Sigma). Ранее было показано, что Rb^+ является аналогом K^+ и что убаин-чувствительный вход Rb^+ должен измеряться в течение короткого временного интервала (5÷10 мин), так как действие убаина на более долгих сроках приводит к существенному увеличению внутриклеточного содержания Na^+ .

Определение внутриклеточного содержания хлора. Для определения внутриклеточного содержания хлора клетки помещали на 90 мин в среду, содержащую изотоп ^{36}Cl (12 мкКюри мл^{-1} , Изотоп, Россия). Радиоактивность ^{36}Cl в экстракте, полученном добавлением к клеточному осадку 5 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, измерялась в сцинтилляционном счетчике (Beckman LS 6500).

Микроскопия и проточная цитометрия. Исследование флуоресценции нативных клеток, окрашенных акридиновым оранжевым (АО), измерение интенсивности малоуглового светорассеяния и определение содержания ДНК на фиксированных препаратах проводили на проточном цитофлуориметре (Розанов, 1988; Розанов и др., 1990). Для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу ДРШ-250-2, а при измерении малоуглового светорассеяния – гелий-неоновый лазер (633 нм). Окрашивание клеток АО (5 мкг/мл) проводили в течение 15÷20 мин при комнатной температуре и концентрации клеток 1 млн/мл. Флуоресценцию возбуждали через интерференционный светофильтр с областью пропускания 450-490 нм; регистрацию флуоресценции проводили в спектральных участках $\lambda = 530 \pm 5$ нм и $\lambda > 620$ нм. Для определения содержания ДНК клетки переводили в раствор, содержащий: ЭДТА 0.02 %, MgCl_2 15 мМ, Тритон X-100 0.1 %, бромистый этидий (БЭ) 20 мкг/мл и оливомицин 40 мкг/мл, рН 7.4. Окрашивание проводили при температуре 4÷6 °С в течение 20÷24 ч. Флуоресценцию возбуждали через фильтр СС-15 (380-470 нм), регистрацию проводили при $\lambda > 600$ нм.

Для прижизненного микроскопирования клеток U937 использовали флуоресцентный микроскоп МИКМЕД-2 (LUMAM PRO-11, ЛОМО) или конфокальный сканирующий микроскоп Leica TCS SL. В первом случае клетки окрашивали в течение 5 мин смесью АО (10 мкг/мл) и БЭ (20 мкг/мл) или Hoechst 33342 (2 мкг/мл, 15 мин). Использовали блок фильтров «Зеленая», а в случае Hoechst 33342 – «Голубая». При работе с микроскопом Leica клетки окрашивали либо смесью АО и БЭ, либо сначала 10 мин мембранотропным зондом RH414, а затем 5 мин АО. Сканирование проводили в двух спектральных диапазонах: 500÷550 нм и 600÷700 нм, возбуждая флуоресценцию лазером 488 нм. На приведенных фотографиях оба изображения совмещены программой Zeiss LSM image browser 3.2.0.70. Диаметр клеток измеряли по фотографиям, полученным на микроскопе Leica TCS-SL, с помощью программы Image J 1.29.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента. За порог достоверности различий принимали значение $P = 0.05$. Приводимое ниже число *n* соответствует, как правило, числу опытов, поставленных в разные дни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Апоптоз, вызванный стауроспорином, сопровождается дегидратацией.

Плавучая плотность клеток при апоптозе, вызванном стауроспорином. Характерная картина распределения клеток U937 в непрерывном градиенте Перколла в норме и при действии на них стауроспорина (STS) и этопозида (Eto) представлена на рис. 1. При действии на клетки STS вся популяция смещается в градиенте в сторону высокой плотности. В среднем плавучая плотность клеток, инкубированных в среде с 1 мкМ STS в течение 4 ч, возросла с 1.040-1.046 до 1.049-1.060 г/мл (табл. 1). Зона, занимаемая клетками в градиенте, составляла при этом 0.011 ± 0.001 г/мл ($n = 10$), то есть несколько расширя

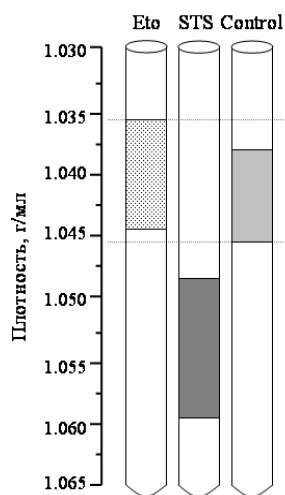


Рис. 1. Распределение клеток в градиенте плотности Перколла после 4 ч инкубации со стауроспорином (STS, 1 мкМ) или этопозидом (Eto, 50 мкМ). Клетки U937-160B2.

лась по сравнению с контрольными клетками, у которых она равнялась 0.006 ± 0.001 г/мл ($n = 16$). В каждом отдельном опыте полоса смещалась обычно так, что нижняя граница у контрольных клеток располагалась выше верхней границы у клеток, инкубированных с STS (рис. 1). Действие STS не приводило к возникновению в плотностном градиенте двух полос, как это мы наблюдали в аналогичных условиях при апоптозе тимоцитов, вызванном этопозидом или дексаметазоном (Веренинов и др., 2003).

Плавучая плотность клеток определяется, главным образом, соотношением содержания в клетке воды, белка и нуклеиновых кислот. Увеличение плотности клеток при действии STS связано с уменьшением удельного содержания воды. Наши данные позволяют количественно определить соотношение между клеточной дегидратацией и уменьшением суммарного содержания основных внутриклеточных осмолитов. Расчет показывает, что наблюдавшееся в опыте увеличение плотности клеток после 4-х часовой инкубации с 1 мкМ STS соответствует уменьшению содержания внутриклеточной воды в среднем на 25 %. Следует отметить, что оценка относительного изменения содержания воды практически не зависит от принятого при расчете значения средней плотности сухой массы клетки.

Ионный состав клеток при апоптозе, вызванном стауроспорином. По сравнению с контрольными клетками внутриклеточное содержание K^+ в апоптозной популяции клеток U937 с уменьшенным объемом снижалось в среднем на 29% (табл.1). Внутриклеточное содержание Na^+ увеличивалось на 13%. Суммарное содержание K^+ и Na^+ при действии STS

снижалось на 20%. Эта величина близка к относительному изменению содержания воды (в среднем на 25 %). В более поздней серии опытов определяли одновременно содержание K^+ , Na^+ и Cl^- . При суммарном снижении содержания K^+ и Na^+ на 0.101 мэквив/г белка снижение содержания Cl^- составляло 0.096 мэквив/г белка, то есть было близким к общему снижению содержания K^+ и Na^+ .

Т а б л и ц а 1

Внутриклеточное содержание воды, K^+ и Na^+ в норме и при апоптозе, вызванном 1 мкМ стауроспорином (STS) и 50 мкМ этопозидом (Eto). Клетки U937-160B2.

Клетки	Плавающая плотность, г/мл	Вода, мл/г белка	K^+ ммоль/г белка	Na^+ ммоль/г белка	$[K^+]$ мМ	$[Na^+]$ мМ	K^+/Na^+
Контроль к STS STS, 1 мкМ, 4 ч	1.04-1.046 (16)	6.7	1.1±0.03	0.30±0.02	164	45	3.9±0.2 (35)
	1.049-1.06 (10)	5.0	0.78±0.03	0.34±0.02	156	68	2.7±0.2 (25)
Контроль к Eto Eto, 50мкМ, 4 ч	1.037-1.045 (7)	7.1	1.16±0.04	0.27±0.01	163	38	4.4±0.2 (20)
	1.036-1.045 (7)	7.1	1.02±0.03	0.35±0.02	143	49	3.0±0.2 (19)

Принципиальным является вопрос, в какой мере апоптотная дегидратация клеток обусловлена выходом из клетки K^+ , Na^+ и Cl^- и в какой - выходом иных внутриклеточных осмолитов. По известному содержанию в клетке воды, K^+ , Na^+ , Cl^- можно вычислить содержание “непроникающих” внутриклеточных осмолитов и их средний электрический заряд. У клеток без жесткой оболочки внутриклеточная осмотическая активность должна равняться общей активности среды, которую можно принять равной 310 мосмоль/л. При содержании воды в клетках 5.52 мл/г белка общая осмотическая активность внутриклеточных осмолитов должна быть равна 1.71 мосмоль/г белка, из которых на K^+ , Na^+ и Cl^- приходится 1.14 мосмоль/г белка, т.е. около 67 % общей внутриклеточной осмотической активности. Относительное изменение суммарного содержания K^+ , Na^+ и Cl^- при апоптозе в 2 -2.5 раза превосходит изменение содержания остальных внутриклеточных осмолитов. Отсюда следует, что в апоптотной дегидратации в исследованном нами случае решающее значение имеет выход K^+ и Cl^- . Средний заряд “остальных” осмолитов у апоптотных клеток остается близким к заряду у нормальных клеток.

Ряд исследователей считает, что изменение внутриклеточной концентрации K^+ при апоптозе изменяет состояние каспаз и нуклеаз (Hughes et al., 1997; Hughes, Cidlowski, 1999). В наших опытах внутриклеточная концентрация K^+ при действии STS снижалась всего лишь на 5% (табл.1). Вряд ли столь незначительное изменение внутриклеточной концентрации K^+ может оказывать существенное влияние на состояние каспаз. Уменьшение концентрации K^+

в расчете на воду, сопровождающееся снижением суммарной концентрации K^+ и Na^+ , о котором говорится в работах с использованием флуоресцентных зондов (McCarthy, Cotter, 1997), свидетельствует о набухании клеток, а набухание клеток – это признак некроза, а не апоптоза (Kerr, 1971). Внутриклеточная концентрации Na^+ увеличивалась при апоптозе у исследованных нами клеток примерно в 1.5 раза и это могло бы быть более существенным фактором по сравнению с изменениями концентрации K^+ .

Поскольку при апоптозе клеток U937, вызванном 1 мкМ STS, были выявлены изменения ионного баланса, необходимо было выяснить, какие тракты участвуют в этом процессе. По вопросу о том, какой транспорт играет главную роль в изменении ионного баланса при апоптозе, насос или K^+ каналы, в литературе высказываются различные мнения. Некоторые исследователи сообщают о снижении активности, либо о деградации субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы при апоптозе (Nobel et al., 2000; Mann et al., 2001; Bortner et al., 2001; Düssmann et al., 2003; Blanco, Nguyen 2008). Другая группа исследователей считает, что ведущую роль при апоптозном изменении ионного баланса играют K^+ каналы (Beauvais et al., 1995; Maeno et al., 2000; Elliot, Higgins, 2003). Мы обнаружили, что механизмы могут быть разными в зависимости от глубины или степени апоптоза и вида клеток. На сублиниях клеток U937-160B2 и U937-N9957 были исследованы изменения баланса потоков главных однозарядных ионов при неглубоком апоптозе, вызываемом стауроспорином (0.2 мкМ, 4÷5 ч). Установлено, что при таком апоптозе относительно небольшое уменьшение внутриклеточного содержания воды (на 10÷13 %) у клеток U937-160B2 обусловлено увеличением интегральной проницаемости K^+ каналов (в 1.4÷1.5 раза) при неизменяющейся активности Na^+/K^+ насоса (рис. 2, 7).

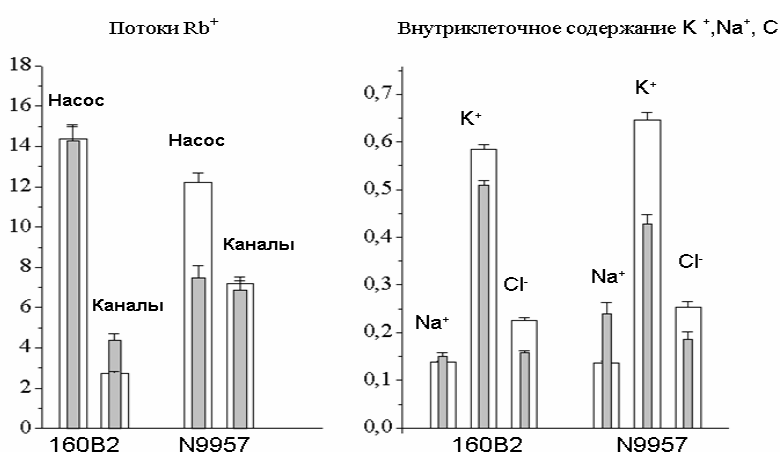


Рис. 2. Потоки Rb^+ через насос и каналы (мкмоль на г белка за 10 мин) и внутриклеточное содержание K^+ , Na^+ и Cl^- (ммоль на г белка) в контроле (светлые столбики) и при 5-ти часовом апоптозе, вызванном 0.2 мкМ стауроспорином (темные столбики) у клеток U937-160B2 и U937-N9957.

У клеток U937-N9957 при такой же дегидратации в строго аналогичных условиях имеет место снижение потоков K^+ и Na^+ через насос (в 1.6 раза), которое не приводит к набуханию клеток из-за того, что параллельно уменьшается интегральная проницаемость Na^+ каналов (в 1.8÷2.3 раза). Это означает, что при слабом апоптозе клеток U937-160B2 основную роль в

изменении ионного баланса играют K^+ каналы, а при слабом апоптозе клеток U937-N9957 - насос. Столь различное поведение этих сублиний при действии стауроспорина наблюдалась только в случае слабого апоптоза, вызванного 0.2 мкМ стауроспорином, когда наблюдалась 10÷13 %-ная дегидратация. На обеих сублиниях при действии стауроспорина суммарное содержание K^+ и Na^+ уменьшалось. Содержание Cl^- также уменьшалось на величину, эквивалентную убыли катионов.

Снижение активности насоса наблюдалось у обеих линий при более глубоком апоптозе, вызванном 1 мкМ стауроспорином и сопровождающемся 18 %-ной дегидратацией. Уабаин-резистентный поток Rb^+ , основную часть которого составляет поток через K^+ каналы, при этом изменяется незначительно. В изменении ионного баланса в этом случае главную роль играет насос (рис. 3).

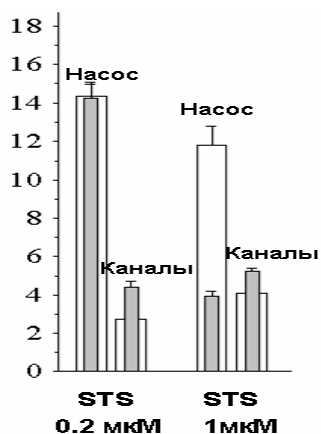


Рис. 3. Потоки Rb^+ через насос и каналы (мкмоль/г белка за 10 мин) в контроле (светлые столбики) и при 5-ти часовом апоптозе клеток U937-160B2, вызванном стауроспорином 0.2 мкМ и 1 мкМ (темные столбики). Клетки U937-160B2

Микроскопия и проточная цитометрия. Инкубация клеток с STS в течение 4 ч приводила к исчезновению ядрышек, хорошо видимых при окрашивании клеток АО в контроле, и харак-

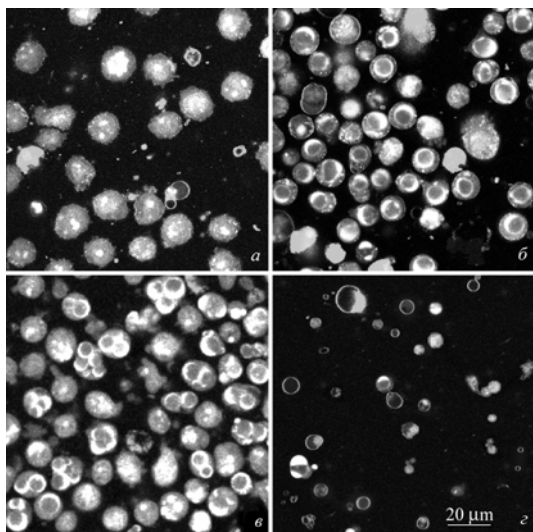


Рис. 4. Морфология клеток U937 после 4-х часовой инкубации с 1 мкМ STS (б) и 50 мкМ этопозидом (в, г). а – контрольные клетки; г – примеры апоптотных телец, образующихся при инкубации клеток с этопозидом (выборка, передающая частоту встречаемости отдельных типов телец). а, б, г – окраска АО в сочетании с RH414, в – окраска только АО. Клетки U937-160B2.

терной конденсации хроматина с образованием как бы «полой» сферы (рис. 4, а, б). Экваториальное сечение таких клеток имеет вид кольца. На поздних стадиях образуются серповидные структуры. Конденсация хроматина при апоптозе, вызванном STS, которую

мы наблюдали на окрашенных АО живых клетках U937, в частности, образование серповидных хроматиновых структур, сходна с тем, что наблюдали другие авторы, изучавшие вызванный STS апоптоз различных клеток миелоидного и лимфоидного ряда с помощью электронной и световой микроскопии после фиксации (Falcieri et al., 1993; Sakahira et al., 1999; Johnson et al., 2000; Maeno et al., 2000). Действие STS проявлялось не только в конденсации хроматина, но и в изменении формы клеток: они округлялись, и их поверхность становилась более «гладкой». Особенно заметно это было при микроскопии в проходящем свете при опущенном конденсоре, когда клетки выглядели как блестящие шарики, и при флуоресцентной микроскопии клеток, окрашенных RH414. После 2-часовой инкубации клеток с STS описанные морфологические изменения можно было наблюдать у относительно немногих, а после 4-х часовой – у большинства клеток. Плавающая плотность клеток, как правило, возрастала уже после 2-х часовой инкубации с STS.

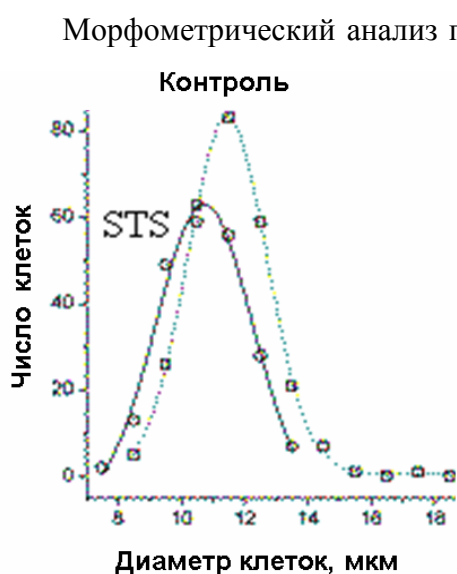


Рис. 5. Распределение по размерам клеток, инкубированных с 1 мкМ STS. Клетки U937-160B2.

Морфометрический анализ показал, что распределение клеток по размеру как в контроле, так и при действии STS, близко к нормальному (рис.5). Диаметр клеток после инкубации с STS 2÷4 ч в среднем по 5 опытам, в которых проводился морфометрический анализ, был на 10 % меньше, чем в контроле. Во всех случаях различия были статистически достоверны.

Структуры, прокрашиваемые АО вне ядра – гранулы оранжевого или, реже, зеленого цвета, – при действии STS выглядели так же, как и в контроле, и располагались преимущественно по периферии клетки. Как и у контрольных клеток, в этом случае наблюдалась диффузная зеленая флуоресценция АО в цитоплазме. Поскольку суммарная флуоресценция живой клетки, окрашенной АО, определяется связыванием этого красителя не только с ДНК,

но и с другими субстратами, гистограмма, полученная проточной цитометрией нативных клеток в зеленой области спектра (рис. 6, а, III, «Green Histogram»), отличается от обычной ДНК-гистограммы, полученной после обработки клеток детергентом и окрашивания ядер и их фрагментов БЭ (6 а, I, «DNA Histogram»). По той же причине не совпадают

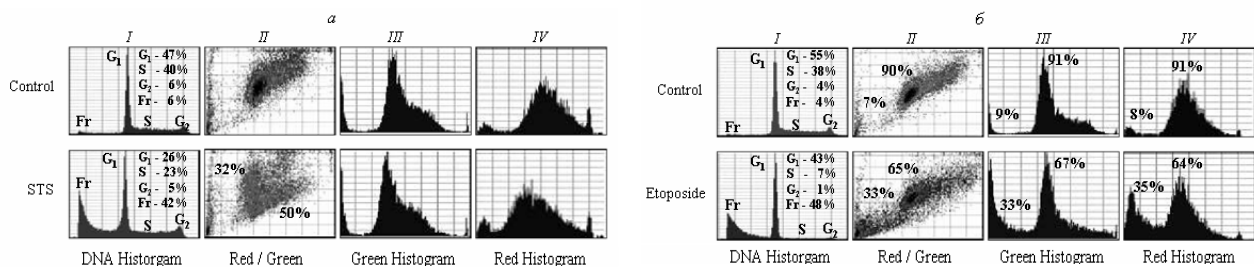


Рис. 6. Проточная цитометрия клеток в норме и при апоптозе, вызванном 1 мкМ STS (а) и 50 мкМ этопозидом (б). Клетки U937-160B2.

гистограммы, полученные на одних и тех же клетках в зеленой (рис. 6, а, III, «Green Histogram») и красной спектральных областях (рис. 6, а, IV, «Red Histogram»). Природа субстратов, связывающих АО в цитоплазме, у разных клеток может быть различной, и идентифицировать ее непросто (Zelenin, 1999). Как бы то ни было, изменение двумерной диаграммы распределения флуоресценции нативных клеток, окрашенных АО, в красном и зеленом каналах (Red/Green) хорошо отражает переход клеток к апоптозу (Лонская и др., 2001). Мы наблюдали изменение такой диаграммы при апоптозе тимоцитов (Веренинов и др., 2003) и при действии на клетки U937 этопозидом (Рис. 6, б, II). При действии STS на клетки U937 изменение двумерной диаграммы Red/Green наблюдалось не во всех опытах и было менее выражено, чем в других, исследованных, нами случаях апоптоза. В опыте, результаты которого приведены на рис.6, а, появлялась субпопуляция клеток, у которых «красная» флуоресценция АО по отношению к «зеленой» усиливалась. Количество таких клеток составляло примерно треть популяции.

Краситель RN414 у клеток U937, как правило, концентрировался в области плазматической мембраны. У некоторых клеток этот краситель интенсивно прокрашивал и цитоплазму. Количество таких клеток варьировало от опыта к опыту обычно в пределах 10÷12 % и коррелировало с количеством клеток, прокрашивавшихся БЭ. При действии STS количество клеток, интенсивно окрашивающихся RN414 и БЭ, не возрастало и даже несколько уменьшалось. Прокрашивание клеток БЭ принято считать признаком поздних стадий апоптоза, когда плазматическая мембрана становится проницаемой для БЭ и образуются комплексы БЭ с ДНК. Долю клеток, прокрашивающихся БЭ, часто используют как меру апоптоза в популяции. Судя по этому признаку мы имели дело с «ранним» апоптозом. С чем связано сплошное прокрашивание клеток RN414, пока неясно.

Анализ ДНК-гистограмм, полученных проточной цитометрией ядер и ядерных фрагментов, показал, что соотношение клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла, если и изменяется после действия STS, то незначительно (рис. 6, а). При апоптозе, вызванном стауроспорином, средние значения отношения S/G1 не отличаются от контрольных (табл.2). Независимость индукции апоптоза STS от фазы клеточного цикла недавно была по-

казана на синхронизированной культуре клеток Jurkat (Than et al., 2001). Субдиплоидный пик на ДНК-гистограммах при действии STS на клетки U937 обычно отсутствовал, но появлялось много ядерных фрагментов. Отметим, что при апоптозе тимоцитов крысы, вызванном STS, субдиплоидный пик на аналогичных ДНК-гистограммах был всегда хорошо выражен (Веренинов и др., 2003). Несмотря на большое количество ядерных фрагментов на ДНК-гистограммах получаемых после фиксации препаратов микрофотографирование нативных клеток при действии STS не выявляло нарастания числа клеточных фрагментов, соответствующих апоптозным тельцам (рис. 6, а). Причина здесь, очевидно, в том, что при действии STS ядерные фрагменты остаются в клетке и освобождаются только при действии детергента в процессе приготовления препарата для проточной флуориметрии ДНК.

Клетки	S/G ₁	G ₂ /G ₁	Fr %	n
Контроль	0.74±0.06	0.13±0.01	5.8±0.9	18
STS	0.76±0.1	0.19±0.03	34.7±5.6	14
Контроль	0.77±0.06	0.14±0.01	5±0.5	21
Этопозид	0.32±0.02	0.08±0.01	26.5±3.8	25

Т а б л и ц а 2

Распределение клеток по фазам клеточного цикла при апоптозе, вызванном STS (1 мкМ, 4 ч) и этопозидом (50 мкМ, 4 ч). Клетки U937-160B2.

ющих апоптозным тельцам (рис. 6, а). Причина здесь, очевидно, в том, что при действии STS ядерные фрагменты остаются в клетке и освобождаются только при действии детергента в процессе приготовления препарата для проточной флуориметрии ДНК.

Апоптоз, вызванный этопозидом, не сопровождается дегидратацией

Плавающая плотность клеток при апоптозе, вызванном этопозидом. Инкубация клеток в течение 4 ч с этопозидом в концентрации 50 мкМ не приводила к увеличению их плавучей плотности (рис.1, табл. 1), несмотря на признаки апоптоза, о которых речь пойдет ниже. Иногда верхняя граница зоны, занимаемой клетками в градиенте, оказывалась даже выше, чем в контроле. В некоторых опытах наблюдалось небольшое уменьшение плавучей плотности после 2-часовой инкубации, когда ни микроскопия, ни цитометрия не позволяли еще заметить признаки апоптоза. Инкубация клеток в течение 18÷24 ч при концентрации этопозидом 0.8÷4 мкМ, сопровождающаяся изменением ДНК-гистограммы, также не приводила к появлению клеток с увеличенной плавучей плотностью.

Ионный состав клеток при апоптозе, вызванном этопозидом. При апоптозе клеток U937, вызванном этопозидом, содержание K⁺ снижалось меньше, чем при действии стауроспорина (табл.1). Увеличение содержания Na⁺ компенсировало уменьшение содержания K⁺, и суммарное содержание K⁺ и Na⁺ практически не изменялось. Это хорошо согласуется с отсутствием дегидратации клеток при действии этопозидом. Концентрация K⁺ во внутриклеточной воде при действии этопозидом снижалась на 12%, а концентрация Na⁺ увеличи-

вася на 29%. Необходимо отметить, что при апоптозе клеток U937, вызванном этопозидом, несмотря на отсутствие дегидратации и изменения суммарного содержания K^+ и Na^+ , а также содержания Cl^- , отношение K^+/Na^+ снижалось (табл. 1, рис. 7, 9), что свидетельствует о перестройке ионного баланса и изменении работы основных трактов переноса ионов через плазматическую мембрану.

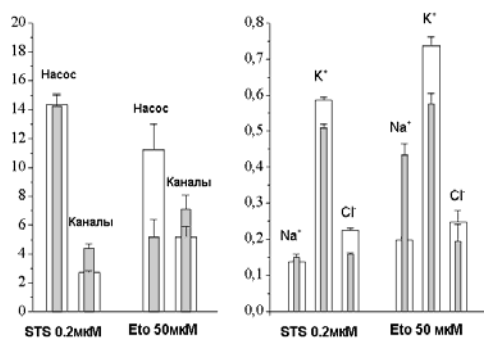


Рис. 7. Потоки Rb^+ через насос и каналы (мкмоль/г белка за 10 мин) и внутриклеточное содержание K^+ , Na^+ и Cl^- (ммоль/г белка) в контроле (светлые столбики) и при 4÷5 часовом апоптозе, вызванном этопозидом 50 мкМ или стауроспорином 0.2 мкМ (темные столбики) Клетки U937-160B2. Опыты 2007 г.

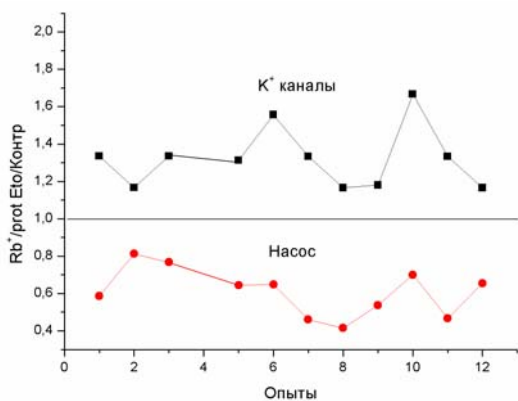


Рис. 8. Отношение потока Rb^+ через насос и каналы при апоптозе, вызванном этопозидом, к потоку в контроле в отдельных опытах. Клетки U937-160B2. Опыты 2008 г.

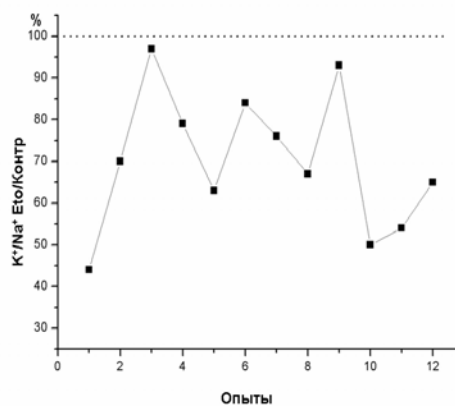


Рис. 9. Изменение отношения K^+/Na^+ при апоптозе вызванном этопозидом, в отдельных опытах. Отношение K^+/Na^+ у контрольных клеток принято за 100 %. Клетки U937-160B2. Опыты 2008 г.

Для того чтобы идентифицировать эти тракты, измеряли уабаин-чувствительный и уабаин-резистентный потоки Rb^+ . При апоптозе клеток U937-160B2, вызванном 50 мкМ этопозидом, уабаин-чувствительный поток Rb^+ снижался в среднем на 43÷54 % в зависимости от серии опытов, а уабаин-резистентный поток возрастал на 30÷37% (рис.7, 8). Это означает, что ионные изменения при апоптозе этих клеток вызваны и деградацией насоса, и открыванием K^+ каналов. Аналогичные изменения происходили и при апоптозе клеток линии U937-N9957.

Микроскопия и проточная цитометрия при апоптозе, вызванном этопозидом. У клеток U937, инкубированных 4 ч с этопозидом в концентрации 50 мкМ, наблюдался комплекс изменений, характерных для апоптоза. К их числу относится образование апоптозных

тел (рис. 4, з). На диаграммах, полученных проточной цитометрией препаратов, окрашенных АО, после 4-часового действия этопозидом возрастало количество мелких частиц (рис. 6, б, II-IV), отражающее увеличение количества апоптозных телец. Количество этих частиц по отношению к числу целых клеток после 4- часового действия этопозидом составляло, в среднем, $45.0 \pm 5.8 \%$ ($n = 9$), тогда как у контрольных препаратов оно не превосходило $7.5 \pm 0.9 \%$. Отметим, что на аналогичных диаграммах, полученных при действии на клетки STS, области, соответствующей апоптозным тельцам, нет, а пик *Fr* на ДНК гистограммах отражает количество ядерных фрагментов, освобождающихся при обработке клеток детергентом (сравни рис. 6, а, III-IV и б, III-IV).

На ДНК-гистограммах, полученных для клеток, инкубированных с этопозидом 4 ч, значительно уменьшалась доля клеток в S-фазе и увеличивалось количество ядерных фрагментов, хотя субдиплоидный пик не выделялся (рис. 6, б, I, табл. 2). Изменение количества апоптозных телец от опыта к опыту хорошо коррелировало с количеством S-фазных клеток в контроле ($R = 0.92$, $P < 0.001$). После 2-х часовой инкубации клеток с этопозидом изменений, подобных описанным выше, мы не наблюдали.

Уменьшение доли S-фазных клеток в опытах с этопозидом хорошо согласуется с данными других исследователей, указывающими на то, что при действии этопозидом и других ингибиторов топоизомеразы 2 в течение 3-6 ч апоптозу подвергаются клетки, проходящие S-фазу (Barry et al., 1993; Kataoka et al., 1994; Endresen et al., 1995; Gorczyca et al., 1993; Than et al., 2001). Это связано, по-видимому, с тем, что именно при репликации проявляется жесткость комплекса топоизомеразы 2 с этопозидом, которая приводит к повреждению ДНК (Hande, 1998).

В ряде опытов с градиента снимали отдельно верхнюю, более легкую, и нижнюю, более тяжелую, часть клеточной популяции и проводили их отдельный анализ. Такие опыты показали, что апоптозных телец и мелких ядерных фрагментов на гистограммах, соответствующих легкой зоне, обычно меньше, чем в случае тяжелой. По ДНК-гистограммам количество мелких ядерных фрагментов в легкой зоне было всегда меньше, чем тяжелой, и их отношение в среднем по 6 опытам составило 0.46 ± 0.06 .

Действие этопозидом в рассматриваемых условиях сопровождалось хорошо выраженной конденсацией хроматина. Характер конденсации при этом существенно отличался от наблюдаемого при действии STS. При действии этопозидом у значительной части клеток хроматин группировался в виде небольшого числа шарообразных тел. Особенно хорошо это было видно при использовании сканирующего конфокального микроскопа (рис. 4, в). При проточной цитометрии нативных клеток фрагменты хроматина, находящиеся в одной клетке, дают общий сигнал, величина которого близка к той, что дают нативные клетки с нефрагментиро-

ванным ядром. Для анализа ДНК-гистограмм клетки по стандартной методике обрабатываются детергентом, клеточная мембрана разрушается, рассматриваемые тела разъединяются и далее регистрируются уже как отдельные частицы. Наряду с клетками, содержащими хроматин в виде группы относительно крупных шаров близкого размера популяция клеток, инкубированных с этопозидом, содержала клетки, от которых отпочковывались небольшие круглые апоптозные тельца, тоже содержащие хроматин. Микроскопия клеток, окрашенных RN414 в комбинации с ДНК-тропными красителями АО или Hoechst 33342, показала, что степень заполнения хроматином апоптозного «пузырька» с мембраной, окрашенной RN414, может быть очень разной (рис. 4, з).

В целом, наблюдавшиеся нами морфологические изменения у клеток U937 соответствуют изменениям, описанным для этой модели апоптоза другими исследователями, изучавшими кроме морфологических изменений также и весь комплекс биохимических маркеров апоптоза (Ghibelli et al., 1995; Garcia-Bermejo et al., 1998; Martinsson et al., 2001; Umeda et al., 2001). Это позволяет заключить, что у исследованных нами клеток при действии этопозида развивался типичный апоптоз, который мог бы считаться «классическим», если бы имело место и снижение внутриклеточного содержания воды. Таким образом, совокупность полученных данных приводит к выводу, что апоптоз может быть и без уменьшения удельного содержания в клетках воды.

В свете полученных нами результатов обязательным признаком апоптоза, отличающим его от некроза, следует считать не клеточное сжатие, а отсутствие набухания вследствие сохранения достаточно низкого уровня проницаемости клеточной мембраны для таких важных клеточных осмолитов, как калий и натрий (Vereninov et al., 2007). Именно по этой причине при апоптозе нет осмотического лизиса, которым всегда сопровождается клеточный некроз.

ВЫВОДЫ

1. Апоптоз клеток U937, вызванный стауроспорином, сопровождается дегидратацией на 2/3 за счет изменения содержания K^+ и Cl^- . Изменение концентрации K^+ во внутриклеточной воде при этом невелико и не может играть существенную роль в развитии апоптоза.
2. Ионные изменения при слабом апоптозе, вызванном стауроспорином, у сублинии U937-160B2 связаны, преимущественно, с увеличением потока $Rb^+(K^+)$ через каналы, а у сублинии U937-N9957 – только с уменьшением потока $Rb^+(K^+)$ через насос.
3. Ионные изменения при сильном апоптозе, вызванном стауроспорином, у сублинии U937-160B2 связаны, преимущественно, с уменьшением потока $Rb^+(K^+)$ через насос.
4. Апоптоз, вызванный у клеток U937 этопозидом, в отличие от апоптоза, вызванного стауроспорином, не сопровождается дегидратацией и тем не менее сопровождается изменением ионного баланса – уменьшением отношения K^+/Na^+ без уменьшения суммарного содержания K^+ , Na^+ и Cl^- , уменьшением потока $Rb^+(K^+)$ через насос и увеличением потока $Rb^+(K^+)$ через каналы.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Веренинов А.А., Волгарева Е. В., Матвеев В. В., Мошков А.В., Розанов Ю.М., **Широкова А.В.**, Юринская В.Е. 2003. Водный и ионный баланс тимоцитов крысы при апоптозе, вызванном дексаметазоном и этопозидом. Ионно-осмотическая модель уменьшения объема клетки. Цитология. 45(5) : 500-509.
2. Веренинов А.А., Горячая Т.С., Матвеев В.В., Мошков А.В., Розанов Ю.М., Сакута Г.А., **Широкова А.В.**, Юринская В.Е. 2004. Дегидратационное сокращение объема клеток при апоптозе – факультативный признак. Цитология. 46(7) : 609-619.
3. Yurinskaya V., Goryachaya T., Guzhova I., Moshkov A., Rozanov Y., Sakuta G., **Shirokova A.**, Shumilina E., Vassilieva I., Lang F., Vereninov A.. 2005. Potassium and sodium balance in U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. Cell Physiology and Biochemistry.16 : 155-162.
4. Yurinskaya V.E., Moshkov A.V., Rozanov Y.M., **Shirokova A.V.**, Vassilieva I.O., Shumilina E. V., Lang F., Volgareva E. V., Vereninov A. A. 2005. Thymocyte K^+ , Na^+ and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. Cell Physiology and Biochemistry 16 : 15-22.
5. **Широкова А.В.** 2007. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. Цитология 49(5) : 385-394.
[**Shirokova A.V.** 2007. Apoptosis. Signaling pathways and cell ion and water balance. Cell and Tissue Biology 1 : 215-224].
6. Веренинов А.А., Горячая Т.С., Матвеев В.В., Мошков А.В., Розанов Ю.М., Сакута Г.А., **Широкова А.В.**, Юринская В.Е. 2003. Уменьшение объема клеток и потеря воды как определяющий признак апоптоза. Цитология 45 (9) : 857. (Тезисы докладов и сообщений, представленных на 1-й всероссийский съезд Общества клеточной биологии).
7. Мошков А.В., Васильева И.О., Веренинов А.А., Матвеев В.В., **Широкова А.В.**, Юринская В.Е. 2003. Механизмы сжатия клеток при апоптозе. Сб. “Итоги исследований по программам СПб НЦ РАН 2001-2003 г.г.” - Наука, СПб. 66-67.
8. Веренинов А.А., Горячая Т.С., Розанов Ю.М., **Широкова А.В.**, Юринская В.Е., Ланг Ф., Рубашкин А.А. 2007. Баланс потоков K^+ , Na^+ и Cl^- через плазматическую мембрану у клеток лимфомы человека U937 в норме и при апоптозе, ионные механизмы апоптозной дегидратации клеток. Цитология 49(9) : 726. (Тезисы докладов и сообщений, представленных на 2-й всероссийский съезд Общества клеточной биологии).
9. Vereninov A.A., Rubashkin A.A., Goryachaya T.S., Moshkov A.V., Rozanov Yu.M., **Shirokova A.V.**, Strelkova E.G., Lang F., Yurinskaya V.E. 2008. Pump and channel K^+ (Rb^+) fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937. Cellular Physiology and Biochemistry 22 : 187-194.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Веренинов А. А., Волгарева Е. В., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2003. Водный и ионный баланс тимоцитов крысы при апоптозе, вызванном дексаметазоном и этопозидом. Ионно-осмотическая модель уменьшения объема клетки. Цитология. 45(5) : 500-509.
- Лонская И.А., Волгарева Е.В., Розанов Ю.М. [Lonskaya, I. A., Volgareva E. V., Rozanov Y. M.] 2001. Two different types of apoptosis in thymocytes. Цитология. 43(3) : 244-249.
- Розанов Ю. М. 1988. Проточная цитометрия. В кн.: Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 136-146.
- Розанов Ю. М., Барский И. Я., Папаян Г. В., Платунов С. Е., Забродин А. С. 1990. Многопараметрический цитометр-анализатор на базе микроскопа «ЛЮМАМ». В кн.: Автоматизация цитологических исследований. Киев: Наук. думка. 136-139.

- Akimova O.A., Poirier M., Kotelevtsev S.V., Hamet P., Orlov S.N. 2008. The death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence against anoikis occurrence. *Apoptosis*. 13(5) : 670-80.
- Barry M. A., Reynolds J. E., Eastman A. 1993. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.* 53 : 2349-2357.
- Beauvais F., Michel L., Dubertret L. 1995. Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K⁺ channels. *J. Leukoc. Biol.* 57 : 851-855.
- Blanco G., Nguyen A.-N. 2008. Ouabain stimulates both proliferation and apoptosis in renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *FASEB J*, 22 : 1157.6.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2002. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death. Differ.* 9 : 1307-1310.
- Bortner C. D., Gómez-Angelats M., Cidlowski J. A. 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276 : 4304-4314.
- Bortner C. D., Sifre M. I., Cidlowski J. A. 2008. Cationic gradient reversal and cytoskeleton-independent volume regulatory pathways define an early stage of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 283 : 7219 - 7229.
- Düssmann H., Rehm M., Kögel D., Prehn J. H. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J. Cell Sci.* 116 : 525-536.
- Elliott J. I., Higgins C. F. 2003. IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep.* 4 : 189-194.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35 : 495-516.
- Endresen P. C., Prytz P. S., Aarbakke J. 1995. A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA. *Cytometry* 20 : 162-171
- Ernest N. J., Habela C W., Sontheimer H. 2008. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death . *J. Cell Sci.*, 121: 290-297.
- Falcieri E., Martelli A.M., Bareggi R., Cataldi A., Cocco L. 1993. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 : 19-25.
- Garcia-Bermejo L., Perez C., Vilaboa N. E., de Blas E., Aller P. 1998. cAMP increasing agents attenuate the generation of apoptosis by etoposide in promonocytic leukemia cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 5) : 637-644.
- Ghibelli L., Maresca V., Coppola S., Gualandi G. 1995. Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages: a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Lett.* 377 : 9-14.
- Gorczyca W., Gong J., Ardelt B., Traganos F., Darzynkiewicz Z. 1993. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 53:3186-3192.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301 : 5-17.
- Hande K. R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34 : 1514-1521.
- Hughes F. M., Jr., Bortner C. D., Purdy G. D., Cidlowski J. A. 1997. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272 : 30567-30576.
- Hughes F. M., Jr., Cidlowski J. A. 1999. Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv. Enzyme Regul.* 39 : 157-171.
- Johnson V. L., Ko S. C., Holmstrom T.H., Eriksson J.E., Chow S.C. 2000. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 17) : 2941-2953.

- Kataoka S., Naito M., Tomida A., Tsuruo T. 1994. Resistance to antitumor agent-induced apoptosis in a mutant of human myeloid leukemia U937 cells. *Exp. Cell Res.* 215 : 199-205.
- Kerr J. F. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105 : 13-20.
- Lang F., Föller M., Lang K.S., Lang P.A., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr Biol.* 205(3) : 147-57.
- Lang F., Föller M., Lang K., Lang P., Ritter M., Vereninov A., Szabo I., Huber S.M., Gulbins E. 2007. Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell death. *Methods Enzymol.* 428 : 209-25.
- Lang F., Shumilina E., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M. 2006. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib Nephrol.* 152 : 142-60.
- Lang F., Gulbins E., Szabo I., Vereninov A., Huber S.M. 2008. Ion channels, cell volume, cell proliferation and apoptotic cell death. In: *Sensing with ion channels*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 69-84.
- Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 9487-9492.
- Mann C. L., Bortner C. D., Jewell C. M., Cidlowski J. A. 2001. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase. *Endocrinology.* 142 : 5059-5068.
- Martinsson P., Liminga G., Nygren P., Larsson R. 2001. Characteristics of etoposide-induced apoptotic cell death in the U-937 human lymphoma cell line. *Anticancer Drugs* 12 : 699-705.
- McCarthy J. V., Cotter T. G. 1997. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death and Differentiation* 4 : 756-770.
- Nobel C. S., Aronson J. K., van den Dobbelen D.J., Slater A. F. 2000. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis.* 5 : 153-163.
- Numata T., Sato K., Okada Y., and Wehner F. 2008. Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. *Apoptosis* 13(7): 895-903.
- Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.* 532 : 3-16.
- Park I. S., Kim J. E. 2002. Potassium efflux during apoptosis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35 : 41-46.
- Sakahira H., Enari M., Ohsawa Y., Uchiyama Y., Nagata S. 1999. Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr. Biol.* 9 : 543-546.
- Shapiro H. M. 1988. *Practical flow cytometry*. New York: Alan R. Liss, Inc. 353 p
- Suzuki K. 2001. Limited proteolysis of filamin is catalyzed by caspase-3 in U937 and Jurkat cells. *J. Biochem.(Tokyo)* 130 : 535-542.
- Than T. A., Ogino T., Omori M., Okada S. 2001. Monochloramine inhibits etoposide-induced apoptosis with an increase in DNA aberration. *Free Radic. Biol. Med.* 30 : 932-940.
- Umeda T., Kouchi Z., Kawahara H., Tomioka S., Sasagawa N., Maeda T., Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. 2001. Limited proteolysis of filamin is catalyzed by caspase-3 in U937 and Jurkat cells. *J. Biochem.(Tokyo)* 130 : 535-542.
- Vereninov A.A., Goryachaya T.S., Moshkov A.V., Vassilieva I.O., Yurinskaya V.E., Lang F., Rubashkin A.A. 2007. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: Recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. *Cell. Biol. Int.* 31: 382-393.
- Yu S. P. 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 70 : 363-386.
- Zelenin, A. V. 1999. *Acridine Orange as a Probe for Cell and Molecular Biology*. In: *Fluorescent and luminescent probes*, 2nd edn. New-York: Academic Press, 117-135.