

ВОДНЫЙ И ИОННЫЙ БАЛАНС ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ АПОПТОЗЕ, ВЫЗВАННОМ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ И ЭТОПОЗИДОМ. ИОНО-ОСМОТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА КЛЕТКИ

© А. А. Веренинов,¹ Е. В. Волгарева, В. В. Матвеев,
А. В. Мошков, Ю. М. Розанов, А. В. Широкова, В. Е. Юринская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ¹ электронный адрес: veren@mail.cytspb.rssi.ru

В связи с анализом осмотической модели уменьшения объема клеток при апоптозе исследовали сдвиги водного и ионного баланса у тимочитов крысы, апоптоз которых вызывали дексаметазоном (1 мкМ, 2—6 ч) или этопозидом (50 мкМ, 5 ч). Внутриклеточное содержание воды определяли по плавучей плотности тимочитов в градиенте Перколл. Содержание К и Na определяли пламенно-эмиссионным анализом. Об апоптозе судили по увеличению плавучей плотности клеток, по флуоресценции клеток, окрашенных акридиновым оранжевым и бромистым этидием (проточная цитометрия), по соотношению фаз клеточного цикла и появлению субдиплоидного пика на ДНК-гистограммах (проточная цитометрия), а также по уменьшению размера клеток под микроскопом. Установлено, что у тимочитов апоптозной субпопуляции с увеличенной плавучей плотностью и меньшими размерами внутриклеточное содержание воды уменьшается, содержание К снижается, Na увеличивается, а их сумма ниже, чем у клеток нормальной плотности. С учетом сопутствующего уменьшения внутриклеточного содержания анионов общее снижение содержания ионов количественно достаточно, для того чтобы объяснить уменьшение объема апоптозных клеток на основе осмотической модели.

Ключевые слова: апоптоз, тимочиты, внутриклеточный калий, внутриклеточный натрий, внутриклеточное содержание воды, дексаметазон, этопозид.

Сокращение объема клеток за счет выхода воды (shrinkage) исторически рассматривалось как главный признак апоптоза, отличающий его от некроза (Керт, 1971). В последние годы развиваются представления, согласно которым оно обусловлено выбросом из клетки калия, как при известной реакции RVD (regulatory volume decrease), наблюдаемой после переноса клеток в гипотоническую среду. По аналогии появился термин AVD (apoptotic volume decrease; Maeno et al., 2000; Okada et al., 2001). Хотя сокращение размеров клеток при апоптозе показано разными методами, мало работ, в которых изменение водного и ионного баланса при апоптозе исследовали прямыми методами. Мы детально исследовали изменение водного баланса и роль ионных осмолитов в апоптозном сокращении размеров клеток, используя ряд известных моделей: 4—6-часовой апоптоз тимочитов крысы, вызванный дексаметазоном и этопозидом, и апоптоз клеток U937 и K562, вызванный этопозидом и стауроспорином. Для определения изменения внутриклеточного содержания воды был применен наиболее чувствительный метод, основанный на измерении плавучей плотности клеток, а для определения содержания К и Na — эмиссионный спектральный анализ. Предварительные данные, полученные этими методами, показали, что апоптоз клеток U937, вызванный этопозидом, не сопровождается уменьшением внутриклеточного содержания воды (shrinkage), как это должно быть, если принять господствующую парадигму. Ввиду

важности этого результата интересно было исследовать в том же плане другие модельные объекты. Рассматриваемый в настоящем сообщении апоптоз тимочитов крысы, вызванный дексаметазоном или этопозидом, представляет интерес как случай, когда осмотический механизм апоптозного уменьшения объема клетки хорошо подтверждается.

Материал и методика

В работе использовали тимочиты 1—2-месячных крысят. Выделенные из декапитированных животных тимусы измельчали в культуральной среде RPMI 1640 («Биолот») с добавлением эмбриональной коровьей сыворотки (10 %, «Биолот») и гентамицина G (100 мкг/мл). Тимочиты выделяли фильтрованием через капроновую сетку, промывали дважды той же средой и центрифугировали при 100 g. В эксперименте использовали суспензию с концентрацией 4—7 млн клеток на 1 мл. Инкубацию контрольных и опытных препаратов проводили в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C в течение 4—6 ч. Для индукции апоптоза использовали дексаметазон фосфат (KRKA, Хорватия) и этопозид (Sigma). Концентрированные растворы дексаметазона (0.8 мМ) и этопозид (34 мМ) готовили на диметилсульфоксиде. В опытах исследовано действие дексаметазона в концентрации 1 мкМ, а этопозид — 50 мкМ.

Разделение тимомитов по плавучей плотности проводили в непрерывном градиенте Перколла (Pharmacia). Раствор Перколла готовили путем разбавления исходного препарата средой RPMI до концентрации 55 %. Для создания необходимой осмотичности добавляли 10-кратный концентрат среды Хенкса (10 % от объема концентрированного Перколла). Формирование градиента плотности проводили центрифугированием полученного раствора в пробирках длиной 95 мм (2 мл) в течение 40 мин при 2000 g в угловом роторе центрифуги K-23 (Janetzki, ГДР). Плотность контролировали маркерами 1.049, 1.062, 1.075, 1.087 и 1.098 г/мл (Sigma).

Сконцентрированную суспензию клеток объемом 100 мкл (20—50 млн клеток) наносили на поверхность раствора Перколла и проводили центрифугирование в течение 10 мин при 400 g в бакет-роторе центрифуги MPW-340 (Польша). После распределения клеток в градиенте отобранные шприцем фракции помещали в конические пробирки объемом 1.5 мл, разбавляли средой RPMI в 4—6 раз и центрифугировали 5 мин при 300 g (центрифуга MPW-310, Польша). Клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI и использовали для определения ионов, микроскопирования и проточной цитометрии.

Для определения ионного состава клетки после осаждения центрифугированием дополнительно 5 раз промывали раствором $MgCl_2$ (96 мМ) без ресуспендирования. Катионы экстрагировали 5 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты (1 мл на пробу) в течение получаса. Преципитат осаждали центрифугированием, концентрацию K и Na в супернатанте определяли эмиссионным анализом в воздушно-пропановом пламени на атомно-абсорбционном спектрофотометре Perkin-Elmer AA-306. В качестве калибровочных растворов использовали растворы KCl и NaCl (10—100 мкМ), приготовленные на 5 %-ной трихлоруксусной кислоте. Содержание ионов в клетке рассчитывали в ммоль на 1 г белка. Количество белка в осадке определяли по Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Исследование флуоресценции клеток, прижизненно окрашенных акридиновым оранжевым (АО) в смеси с бромистым этидием (БЭ), измерение интенсивности малоуглового светорассеяния нативных клеток и определение содержания ДНК на фиксированных препаратах проводили на ранее описанном 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 тимомитов смесью АО (5 мкг/мл) и БЭ (20 мкг/мл) проводили в течение 15—20 мин при комнатной температуре при концентрации клеток 1 млн/мл без последующей отмывки красителя. Флуоресценцию возбуждали через интерференционный светофильтр с областью пропускания 450—490 нм, регистрацию флуоресценции проводили в спектральных участках $\lambda = 530 \pm 5$ нм (F_{530}) и $\lambda > 620$ нм (F_{620}).

Для определения содержания ДНК клетки переводили в раствор, содержащий 0.02 % ЭДТА, 15 мМ $MgCl_2$, 0.1 % Тритона X-100, 20 мкг/мл БЭ и 40 мкг/мл оливомицина, pH 7.4. Окрашивание проводили при температуре 4—6 °C в течение 20—24 ч. Флуоресценцию возбуждали через фильтр CC-15 (380—470 нм), регистрацию проводили при $\lambda > 600$ нм.

Прижизненное микроскопирование тимомитов проводили на микроскопе «Микомед» (ЛОМО), снабженном CCD-камерой. Для определения размеров клеток использовали микрофотографии клеточных препаратов, полученные в проходящем свете с опущенным конденсором и объективом 40/0.85. Диаметр сферических клеток определяли с помощью программ «Видео-тест размер» («ВидеоТест», Санкт-Петербург, Россия) и IMAGEJ 1.26t (NIH, Bethesda). Диаметр некруглых клеток находили по формуле $d = 2\sqrt{S/\pi}$, где S — площадь проекции клетки. Значения распределяли по классам, число которых выбирали в зависимости от размера популяции. Стандартная ошибка среднего во всех случаях не превышала 1 %. Учитывали только клетки, которые не окрашивались БЭ. При регистрации флуоресценции использовали блок светофильтров «Зеленый» с запирающими светофильтрами ЖС18 и ЖС19 и объектив 40/0.85.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента. За порог достоверности различий принимали значение $P = 0.05$.

Результаты

Использованные в наших опытах тимомиты 1-месячных крысят распределялись в пробирке с непрерывным градиентом Перколла двумя полосами, как это показывают схемы на рис. 1. После обработки тимомитов дексаметазоном или этопозидом появлялась обособленная тяжелая субпопуляция, в которую попадало через 5—6 ч, судя по белку, 20—40 % суммарного количества клеток во всех фракциях. Появление тяжелой фракции при действии на тимомиты дексаметазона и этопозидов, по современным данным, обусловлено их апоптозом и сопровождается рядом характерных признаков, таких, в частности, как конденсация хроматина и интернуклео-сомная фрагментация ДНК (Thomas, Bell, 1981; Wyllie, Morris, 1982; Cohen et al., 1993). Хорошо выраженная в непрерывном градиенте Перколла обособленность тяжелой фракции указывает на «скачкообразность» перехода клеток в состояние с высокой плотностью. Скачкообразность изменения состояния тимомитов при апоптозе, проявляющаяся в изменении их размера, была предметом детального анализа в работе Хьюдеса и Сидловского (Hughes, Cidrowski, 1998).

Построение двумерных диаграмм интенсивности красной и зеленой флуоресценции нативных клеток, полученных проточной цитометрией после окрашивания АО, представляет собой еще один способ анализа реакции клеточной популяции на действие индукторов апоптоза (Lonskaya et al., 2001). Результаты подобного рода проточной цитометрии отдельных плотностных фракций и нефракционированных популяций тимомитов в двух типичных опытах представлены на рис. 2 и 3. На двумерной «красно-зеленой» диаграмме тимомитов, окрашенных АО, уже и в контрольной популяции, не подвергавшейся действию дексаметазона или этопозидов, выявляются 3 облака, из которых облако 1 соответствует «нормальным» клеткам, а облака 2 и 3 — тем субпопуляциям, относительно количество клеток в которых существенно возрастает при действии на тимомиты дексаметазона или этопозидов. При этом доля клеток с менее интенсивной красной флуоресценцией (об-

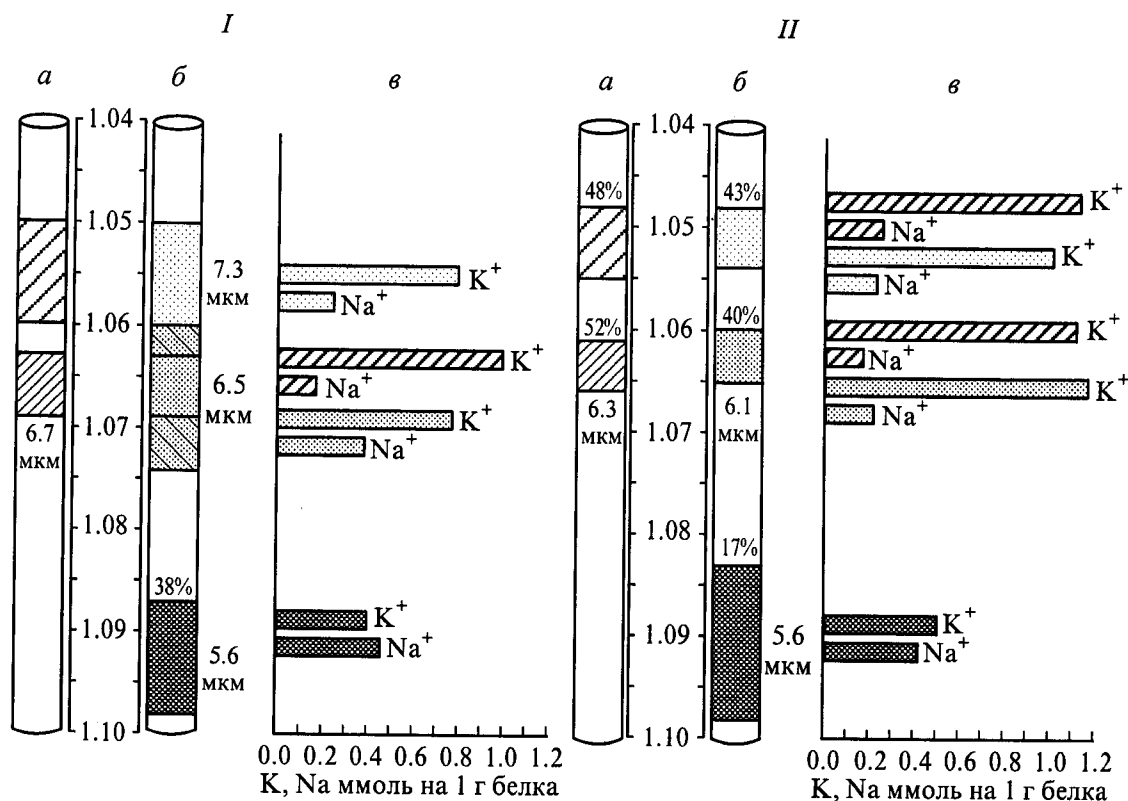


Рис. 1. Фракционирование тимоцитов в градиенте плотности и внутриклеточное содержание К и Na в субпопуляциях после воздействия дексаметазона (I) и этопозид (II).

По вертикали — плавучая плотность клеток, г/мл; по горизонтали — содержание катионов, ммоль на 1 г белка. а — схема распределения тимоцитов в градиенте Перколлы в контроле; б — то же при действии индукторов апоптоза; в — содержание катионов, вид штриховки показывает, к какой субпопуляции тимоцитов относятся значения содержания катионов. Относительное количество клеток (белка) во фракциях дано в процентах к суммарному содержанию во всех фракциях. Для исследования фракции 1.061—1.072 г/мл, показанной на I, б, клетки были взяты из той же плотностной зоны, что и аналогичная фракция контрольных клеток. Приведенные средние диаметры тимоцитов отдельных фракций получены световой микроскопией. Концентрация и продолжительность действия дексаметазона и этопозид 1 мкМ, 6 ч и 50 мкМ, 5 ч соответственно. Контрольные клетки выдерживали в тех же условиях без индукторов. Опыты I и II проведены на тимocyтах 4-недельных крысят одного помета.

лако 2) четко коррелирует с плотностью, в то время как доля клеток в облаке 3 (более интенсивная красная флуоресценция) с изменением плотности связана слабее (ср. варианты а—в и б—г на рис. 3). Облака 3 никогда не было на аналогичных диаграммах, полученных нами при индукции апоптоза на культуре пролиферирующих клеток U937 и Jurkat. Вероятнее всего, оно связано с известной по многим другим признакам гетерогенностью лимфоцитов, выделяемых из тимуса (Бернет, 1971, Shortman, 1971; Жербин и др., 1982; Cohen et al., 1993; Ormerod et al., 1993). Изменение общего соотношения между нормальными и апоптозными тимocyтами при переходе от фракции с плотностью 1.060—1.070 г/мл к фракции с плотностью 1.083—1.098 г/мл отчетливо видно и на обычных гистограммах флуоресценции клеток в зеленом спектре (рис. 2, II; 3, II). Вместе с тем приведенные примеры показывают, что анализ флуоресценции клеток, окрашенных АО, одновременно в красной и зеленой областях спектра является более мощным средством выявления гетерогенности клеточной популяции по характеру ответа на испытанные индукторы апоптоза.

ДНК-гистограммы фиксированных тимоцитов показывают, что после индукции апоптоза, распределение клеток по фазам клеточного цикла наиболее существенным образом изменяется в тяжелой фракции (рис. 2, IV, г, 3, д). В этом случае практически не остается клеток в

фазе G₂. Весьма характерными особенностями тяжелой фракции являются субдиплоидный пик и большое количество мелких фрагментов. Отметим попутно, что в легкой плотностной фракции клеток в S-фазе больше, чем в средней и тяжелой фракциях. Это относится и к контролю, и к опыту.

Микроскопирование тимоцитов в проходящем свете позволяет уловить уменьшение размеров клеток тяжелой, апоптозной, субпопуляции. Так, например, в опытах, результаты которых приведены на рис. 1, среднее значение диаметра тимоцитов тяжелой фракции 1.083—1.098 г/мл было достоверно (на 8—14 %) меньше среднего значения во фракции 1.060—1.072 г/мл. Это соответствует уменьшению объема клеток на 23—36 %. Более детальный анализ показал, что распределение по размерам тимоцитов в нефракционированных образцах асимметрично, а после фракционирования в градиенте Перколлы приближается к нормальному (рис. 4).

Распределение клеток по малоугловому светорассеянию в тяжелой фракции (1.083—1.098 г/мл) отличалось от распределения во фракции с плотностью 1.060—1.069 г/мл шириной и небольшим смещением максимума в сторону большей интенсивности (рис. 2, III; 3, III). Таким образом, в наших условиях регистрация малоуглового светорассеяния его интенсивность изменялась в сторону, противоположную изменению размеров клеток. Аналогичное смещение мы наблюдали на клет-

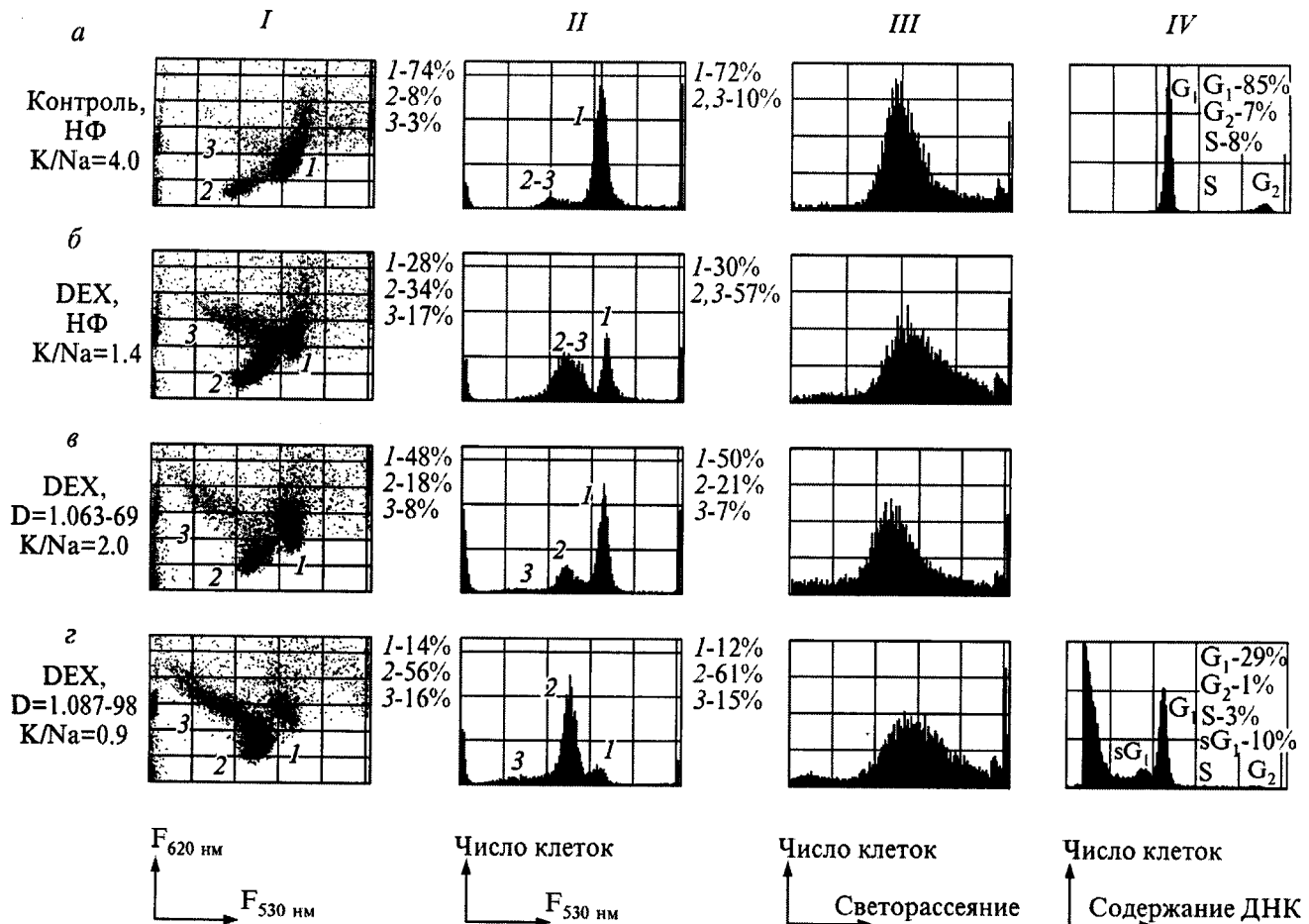


Рис. 2. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции акридинового оранжевого (АО) (I, II), малоугловому светорассеянию (III) и содержанию ДНК (IV) при апоптозе тимоцитов, вызванном дексаметазоном (DEX).

По горизонтали: I, II — флуоресценция АО при 530 нм (F_{530}), усл. ед.; III — малоугловое светорассеяние, усл. ед.; IV — содержание ДНК на частицу, усл. ед. По вертикали: I — флуоресценция АО при 620 нм (F_{620}), усл. ед.; II, III — число клеток. а — нефракционированная популяция контрольных клеток (НФ); б — НФ-популяция тимоцитов, обработанных дексаметазоном (DEX, 1 мкМ, 6 ч); в — фракция тимоцитов, обработанных дексаметазоном, с плотностью 1.063—1.069 г/мл; г — то же, фракция с плотностью 1.087—1.098 г/мл. K/Na — отношение внутриклеточного содержания К к содержанию Na. На I, II справа показана доля клеток в субпопуляциях, различающихся по флуоресценции АО. 1 — клетки с высокой общей интенсивностью флуоресценции, 2 — клетки с низкой общей интенсивностью флуоресценции, 3 — клетки с низкой интенсивностью флуоресценции при 530 нм и высокой — при 620 нм. На IV, а и IV, г указана доля клеток в различных фазах клеточного цикла (G_1 , G_2 и S) и субдиплоидной популяции (sG_1). Приведены данные, полученные в том же эксперименте, что и на рис. 1, I.

ках K562, помещенных в гипертоническую среду, когда потеря воды и уменьшение объема клетки несомненны.

Для выяснения механизма уменьшения размеров клеток существенно сопоставить изменения содержания воды и ионов (рис. 1; табл. 1, 2). По плавучей плотности клеток можно оценить содержание внутриклеточной воды в расчете на сухую массу клетки, если известно, какова плотность сухой массы. Плотность сухой массы клеток, подобных тимоцитам, по нашей оценке, основанной на разных соображениях, не выходит за пределы интервала 1.35—1.55 г/мл. В табл. 2 приведены расчетные значения содержания воды, полученные при трех предполагаемых значениях средней плотности сухой массы клеток и найденной в опыте плавучей плотности контрольных (1.064 г/мл) и апоптозных (1.089 г/мл) клеток. Содержание воды в контрольных клетках составляет 3.3—4.9 мл на 1 г сухой массы, а в апоптозных — 2.2—3.3 мл на 1 г. Содержание внутриклеточной воды в контрольных тимоцитах при плотности сухой массы 1.45 попадает в интервал

значений, полученных другими методами (Lichtman et al., 1972).

Какое бы значение плотности сухой массы из приведенных в табл. 2 ни принять, содержание воды в тимоцитах апоптозной фракции оказывается на 32—35 % ниже, чем в контрольных клетках. Такое же снижение объема тимоцитов в связи с апоптозом, вызванным дексаметазоном (1 мкМ, 2 ч), наблюдали Хьюдженс и соавторы, измерявшие объем тимоцитов с помощью электрического измерителя Колтера (Hughes et al., 1997). Если потеря воды составляет 32—35 %, то и общая потеря осмотиков должна быть такой же. Суммарное содержание К и Na в тимоцитах апоптозной субпопуляции ниже, чем в контроле, примерно на 20 % (табл. 1, 2). Уменьшение содержания катионов должно быть сопряжено с эквивалентным изменением содержания внутриклеточных анионов, и если это однозарядные анионы, суммарное снижение содержания ионных осмотиков должно составлять 40 %. Кроме ионных осмотиков в клетке, несомненно, имеются и неионные осмотиты. Поэтому относительное изменение суммы осмотиков (32—

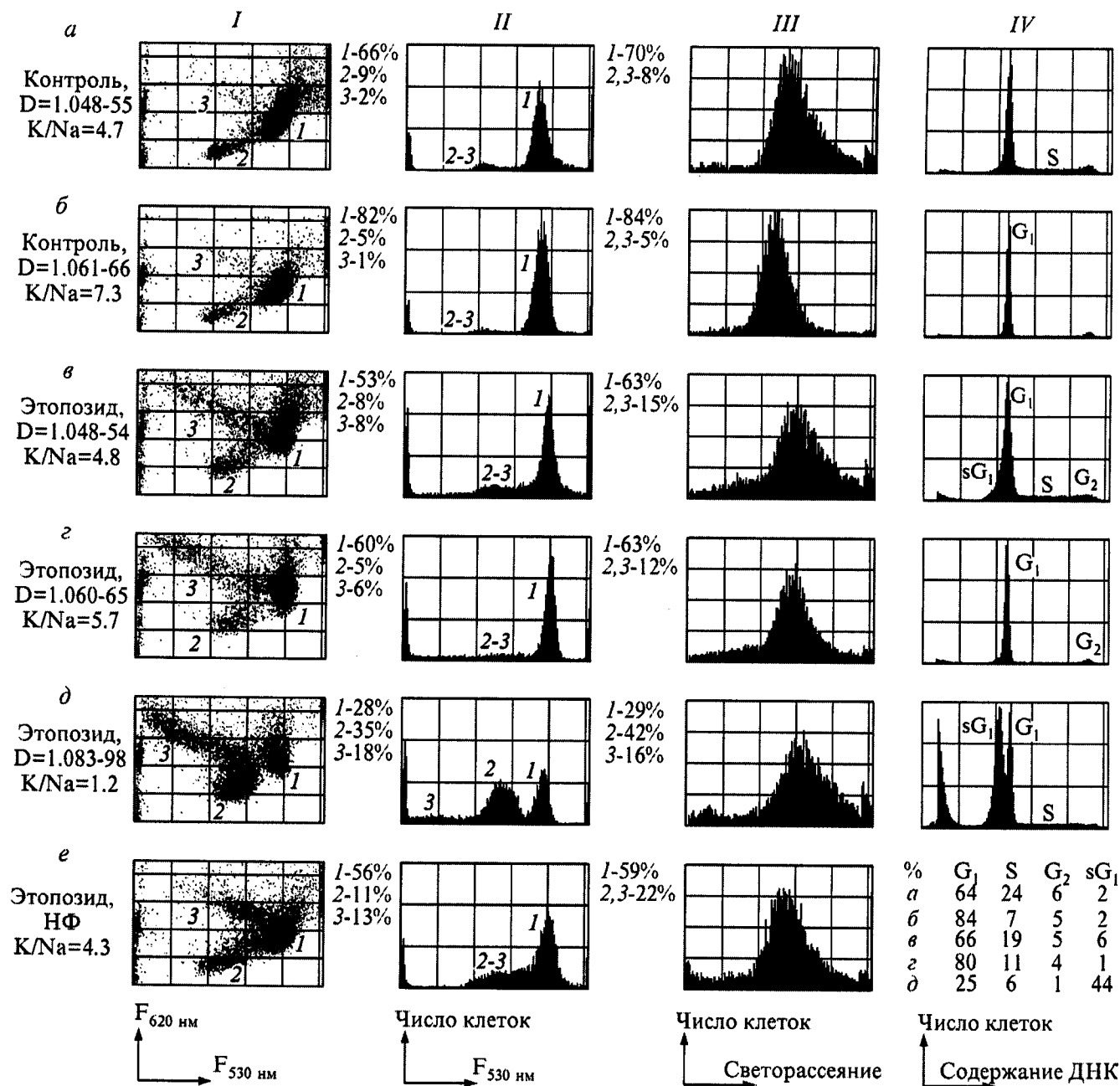


Рис. 3. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции АО (I, II), малоугловому светорассеянию (III) и содержанию ДНК (IV) при апоптозе тимоцитов, вызванном этопозидом.

а — фракция контрольных клеток с плотностью 1.048—1.055 г/мл; б — то же, фракция с плотностью 1.061—1.066 г/мл; в — фракция тимоцитов, обработанных этопозидом, с плотностью 1.048—1.054 г/мл; г — то же, фракция с плотностью 1.060—1.065 г/мл; д — то же, фракция с плотностью 1.083—1.098 г/мл; е — нефракционированная (НФ) популяция тимоцитов, обработанных этопозидом (50 мкМ, 5 ч). Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Приведены данные, полученные в том же эксперименте, что и на рис. 1, II.

35 %) оказывается меньше относительного изменения содержания ионов (40 %). Каким бы приближенным ни был этот расчет, он показывает, что перераспределение ионных осмотиков играет основную роль в уменьшении внутриклеточного содержания воды и объема тимоцитов при апоптозе, вызванном дексаметазоном. Аналогичное изменение содержания ионов и плавучей плотности наблюдалось и при действии на тимоциты этопозид (рис. 1).

При известном значении содержания воды в тимоцитах можно рассчитать концентрацию К и Na во внутриклеточной воде. Данные, полученные при разных

вариантах расчета, приведены в табл. 2. При плотности сухой массы клетки 1.45 и содержании белка в сухой массе 65 % концентрация К по расчету снижается от 142 мМ в тимоцитах с плотностью 1.064 г/мл до 132 мМ в клетках с плотностью 1.089 г/мл. Концентрация Na при этом возрастает с 28 до 72 мМ. Таким образом, относительное изменение концентрации Na в расчете на воду значительно и больше, чем в расчете на сухую массу или белок, в то время как относительное изменение концентрации К в расчете на воду очень невелико и существенно меньше, чем в расчете на белок.

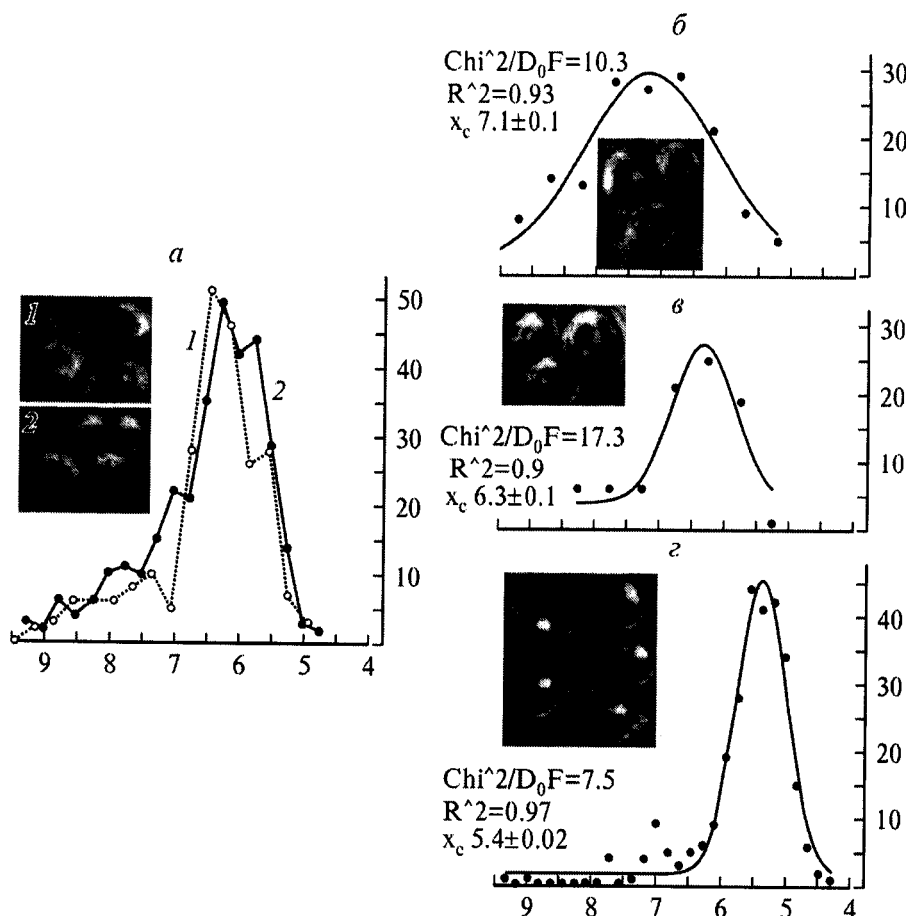


Рис. 4. Влияние дексаметазона на распределение тимоцитов по размерам в нефракционированной популяции (а) и в трех фракциях с различной плавучей плотностью (б—г) по данным световой микроскопии.

По горизонтали — диаметр клетки, мкм; по вертикали — количество клеток с данным диаметром. Аппроксимация функцией Гаусса, расчет медианы распределения (x_c), критериев хи-квадрат (χ^2) и R^2 проведены программой Origin 6.1. На вставках приведены микрофотографии клеток. Определение размеров проводили на 10—12 полях, содержащих по 10—20 клеток одного варианта. Микроскоп «Микомед» (ЛОМО), об. 40/0.85. а — нефракционированные популяции контрольных тимоцитов (1) и тимоцитов, обработанных дексаметазоном (2); б — фракция тимоцитов, обработанных дексаметазоном (DEX), с плотностью 1.050—1.060 г/мл; в — то же, фракция с плотностью 1.063—1.069 г/мл; г — то же, фракция с плотностью 1.087—1.098 г/мл. Данные получены в том же эксперименте, что и на рис. 1, 1.

Обсуждение

Представление о том, что характерное для апоптоза сокращение размеров клеток подобно реакции регуляторного уменьшения объема (RVD) вызвано уменьшением содержания внутриклеточной воды и осмолитов, в первую очередь К, развивается многими авторами (Hughes et al., 1997; Maeno et al., 2000; см. обзоры: Mon-

tague et al., 1999; Gómez-Angelats et al., 2000, Okada et al., 2001; Yu et al., 2001). Эта концепция основывается главным образом на общих соображениях и на том, что при апоптозе изменяется состояние ионных каналов (см. обзоры: Lang et al., 1998, 1999, 2000), а экспериментальное изменение внутриклеточного содержания К и Na влияет на развитие апоптоза (Offen et al., 1995; McCarthy, Cotter, 1997; Fernández-Segura et al.,

Т а б л и ц а 1

Влияние дексаметазона (1 мкМ, 4—6 ч) на содержание катионов в тимоцитах с разной плавучей плотностью

Вариант опыта	n	Плотность, г/мл	Содержание К и Na, ммоль на 1 г белка, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$		
			К + Na	К	Na
Контроль	5	1.060—1.067	1.09 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.03
Дексаметазон	7	1.060—1.067	1.03 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03
Дексаметазон	3	1.082—1.095	0.88 $\pm$ 0.04 ^a	0.57 $\pm$ 0.10 ^a	0.31 $\pm$ 0.04

^a Различие с контролем достоверно при $P < 0.03$.

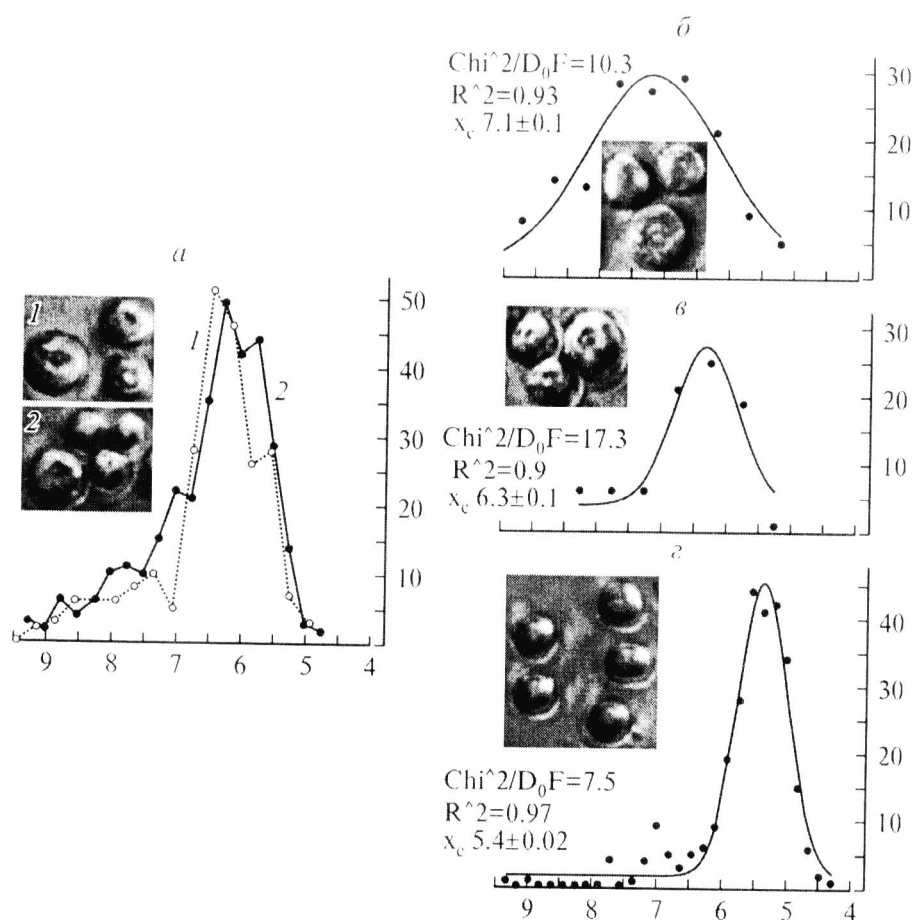


Рис. 4. Влияние дексаметазона на распределение тимоцитов по размерам в нефракционированной популяции (а) и в трех фракциях с различной плавучей плотностью (б–г) по данным световой микроскопии.

По горизонтали — диаметр клетки, μm ; по вертикали — количество клеток с данным диаметром. Аппроксимация функцией Гаусса, расчет медианы распределения (x_c), критериев хи-квадрат (χ^2) и R^2 проведены программой Origin 6.1. На вставках приведены микрофотографии клеток. Определение размеров проводили на 10–12 полях, содержащих по 10–20 клеток одного варианта. Микроскоп «Микомед» (ЛОМО), об. 40/0.85. а — нефракционированные популяции контрольных тимоцитов (1) и тимоцитов, обработанных дексаметазоном (2); б — фракция тимоцитов, обработанных дексаметазоном (DEX), с плотностью 1.050–1.060 г/мл; в — то же, фракция с плотностью 1.063–1.069 г/мл; г — то же, фракция с плотностью 1.087–1.098 г/мл. Данные получены в том же эксперименте, что и на рис. 1, I.

Обсуждение

Представление о том, что характерное для апоптоза сокращение размеров клеток подобно реакции регуляторного уменьшения объема (RVD) вызвано уменьшением содержания внутриклеточной воды и осмолитов, в первую очередь К, развивается многими авторами (Hughes et al., 1997; Maeno et al., 2000; см. обзоры: Mon-

tague et al., 1999; Gómez-Angelats et al., 2000, Okada et al., 2001; Yu et al., 2001). Эта концепция основывается главным образом на общих соображениях и на том, что при апоптозе изменяется состояние ионных каналов (см. обзоры: Lang et al., 1998, 1999, 2000), а экспериментальное изменение внутриклеточного содержания К и Na влияет на развитие апоптоза (Offen et al., 1995; McCarthy, Cotter, 1997; Fernández-Segura et al.,

Таблица 1

Влияние дексаметазона (1 мкМ, 4–6 ч) на содержание катионов в тимоцитах с разной плавучей плотностью

Вариант опыта	n	Плотность, г/мл	Содержание К и Na, ммоль на 1 г белка, $\bar{x} \pm s_x$		
			К + Na	К	Na
Контроль	5	1.060–1.067	1.09 ± 0.05	0.91 ± 0.04	0.18 ± 0.03
Дексаметазон	7	1.060–1.067	1.03 ± 0.03	0.82 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Дексаметазон	3	1.082–1.095	0.88 ± 0.04^a	0.57 ± 0.10^a	0.31 ± 0.04

^a Различие с контролем достоверно при $P < 0.03$.

Таблица 2

Содержание воды и концентрация катионов при апоптозе тимоцитов, вызванном дексаметазоном

Плотность клетки в целом (измерение)	Плотность сухой массы клетки (предположение)	Содержание воды (расчет)		Содержание К и Na, ммоль на 1 г белка (измерение)		Концентрация ^a К и Na, мМ (расчет)	
		г/мл	мл на 1 г сухой массы	%	К	Na	К
1.064	1.35	3.31	100	0.91	0.18	179	35
1.089	1.35	2.17	65.6	0.57	0.31	171	93
1.064	1.45	4.16	100	0.91	0.18	142	28
1.089	1.45	2.80	67.3	0.57	0.31	132	72
1.064	1.55	4.90	100	0.91	0.18	121	24
1.089	1.55	3.34	68.2	0.57	0.31	111	60

^a При вычислении концентрации в расчете на воду принято, что доля белка в сухой массе составляет 65 %.

1999; Orlov et al., 1999; Salido et al., 2001). Работ, в которых ионный и водный баланс клеток при апоптозе исследовался путем прямых анализов и параллельно, мало, и по имеющимся в литературе данным трудно судить, насколько универсальна эта концепция. Тимокиты относятся к числу клеток, у которых апоптоз — «нормальная» стадия их эволюции в организме. Это любимый объект для изучения общих механизмов апоптоза. Определение плавучей плотности давно используется для селекции субпопуляции тимокитов, претерпевающих апоптоз (Yamada, Ohya, 1980, 1988; Ohya et al., 1981; Thomas, Bell, 1981; Wyllie, Morris, 1982; Cohen et al., 1993). Появление субпопуляции тяжелых клеток при апоптозе, вызванном дексаметазоном и этопозидом в наших опытах, хорошо согласуется с данными, полученными предшественниками.

По данным Жербина и соавторов (1982), соотношение белка и ДНК в тимокитах тяжелой субпопуляции такое же, как и в тимокитах с плотностью 1.077 г/мл. Если это так, то плотность сухого вещества клетки при апоптозе не изменяется, и увеличение плавучей плотности отражает уменьшение содержания внутриклеточной воды. Таким образом, данные, полученные при исследовании размеров и плавучей плотности тимокитов и в наших опытах, и у предшественников, вполне отвечают парадигме: уменьшение удельного содержания воды в клетке — характерный признак апоптоза.

Несмотря на то что ни на каком другом объекте не было получено столь надежных данных, указывающих на уменьшение содержания воды при апоптозе, как на тимокитах, вопрос о природе выходящих при этом из клетки осмолитов мало изучен. Данные по изменению ионного состава тимокитов при апоптозе немногочисленны, неполны и противоречивы. На тимокитах мыши, апоптоз которых вызывали допамином и дексаметазоном, проводили элементный рентгеновский микроанализ (Offen et al., 1995). Авторы сообщают о 6-кратном (!) снижении внутриклеточного содержания К и увеличении содержания Na после 3-часового действия дексаметазона в очень высокой концентрации (1 мМ). Определения содержания Na, по-видимому, были полуколичественными, и суммарное содержание К и Na не приводится. Судя по столь сильному снижению содержания К, имела место глубокая деградация клеток, связанная с их некрозом. Только снижение содержания К, сопровождающееся снижением суммарного содержания К и

Na, когда есть основание предполагать снижение объема клеток, может интерпретироваться как связанное с апоптозом (см. «Приложение»).

Хьюдженс и соавторы (Hughes et al., 1997) исследовали изменение внутриклеточного содержания К в тимокитах при действии дексаметазона (1 мкМ, 2—8 ч) с помощью К-чувствительного флуоресцентного зонда в проточном цитометре и прямого масс-спектрометрического анализа. Они сообщают об уменьшении интенсивности флуоресценции зонда на 95 % (!) в апоптотной субпопуляции, отсортированной по малоугловому и боковому светорассеянию. Концентрация К в расчете на внутриклеточную воду, по данным масс-спектрометрии, в течение первых 2 ч оставалась, как в контроле, на уровне 140 мМ. К сожалению, авторы не указывают, каким образом они оценивали содержание внутриклеточной воды, и не приводят данных по натрию. Что касается малого изменения концентрации К в расчете на воду, «парадоксального», по мнению Хьюдженса и соавторов, то наши определения содержания катионов и оценка концентрации К и Na во внутриклеточной воде (табл. 2) показывают, что концентрация К в расчете на воду и не должна сильно изменяться, если именно выход К, главного внутриклеточного осмолита, приводит к уменьшению содержания воды.

Сходные результаты были получены при использовании калиевого флуоресцентного зонда и прямого пламенно-эмиссионного анализа содержания К в тимокитах мыши при апоптозе, вызванном дексаметазоном (Dallaporta et al., 1998). В этой работе ослабление флуоресценции зонда на ранней стадии апоптоза опережало изменение малоуглового светорассеяния, т. е. предшествовало уменьшению размеров клеток. По данным пламенно-фотометрического анализа, внутриклеточное содержание К уменьшалось на поздней стадии апоптоза, когда разность электрических потенциалов на клеточной мембране существенно снижалась.

Работ, в которых исследовали изменения внутриклеточного содержания ионов при апоптозе других клеток, тоже немного. С помощью рентгеновского микроанализа на клетках U937 показано, что при апоптозе, вызванном ультрафиолетовым облучением, содержание К снижается с 391 до 196 ммоль на 1 г сухой массы, а содержание Na увеличивается с 52 до 198 ммоль на 1 г (Fernández-Segura et al., 1999). Прямое сопоставление изменения содержания ионов с изменением содержания

воды или объема клеток при этом виде анализа затруднительно, но обнаруженное уменьшение суммарного содержания K и Na с 440 до 394 мкмоль на 1 г сухой массы можно рассмотреть как указание на снижение содержания воды и объема клеток. Снижение суммарного содержания K и Na при одновременном снижении отношения K/Na в цитируемой работе хорошо согласуется с нашими результатами, полученными на тимоцитах при действии дексаметазона и этопозидом с помощью пламенно-эмиссионного анализа.

Похожие данные получены с помощью рентгеновского микроанализа на моноцитах человека, апоптоз которых был вызван окисленными липопroteидами низкой плотности (Skepper et al., 1999). На этом объекте через 6 ч концентрация K снижалась до 291 против 616 мкмоль на 1 г сухой массы в контроле, а концентрация Na увеличивалась до 103 против 42 мкмоль на 1 г. Эти изменения сопровождались снижением концентрации Cl со 152 до 58 мкмоль на 1 г, а фосфора — с 672 до 465 мкмоль на 1 г. Снижение отношения K/Na, сопровождающееся снижением суммарного содержания K и Na и содержания Cl, показано с помощью рентгеновского микроанализа на линии клеток простаты PC-3 при апоптозе, вызванном этопозидом (Salido et al., 2001).

Барбиеро и соавторы (Barbiero et al., 1995) исследовали апоптоз фибробластов мыши линии L, вызванный этопозидом, а изменение флуоресценции калиевого (PBFI) и натриевого (SBFI) зондов проводили в монослое. Они пришли к выводу о том, что на 3-и сут действия этопозидом концентрация K у «апоптозных» клеток становится ниже 50 мМ (18 % клеток), а концентрация Na — выше 30 мМ (6 % клеток). В контрольных клетках, по данным этой работы, концентрация K в расчете на воду составляла 110, а Na — 15 мМ. Что собой представляют клетки, у которых концентрация Na 30 мМ, а концентрация K 50 мМ, если принять, что именно такие клетки находятся на границе, разделяющей нормальные и «апоптозные», по Барбиеро, клетки? Можно показать (см. «Приложение»), что клетки, у которых суммарная концентрация K и Na в расчете на внутриклеточную воду ниже, чем у нормальных клеток, имеют объем выше нормального. Иначе говоря, это набухшие клетки.

Об уменьшении внутриклеточной концентрации как K, так и Na в клетках HL-60 при ультрафиолетовом облучении сообщают МакКарти и Коттер (McCarthy, Cotter, 1997), использовавшие K- и Na-чувствительные флуоресцентные зонды. Прямых анализов внутриклеточного содержания K и Na в этой работе не проводили. За апоптозные клетки принимали тимоциты с уменьшением малоугловым светорассеянием, т. е. уменьшенного, по мнению МакКарти и Коттера, размера. В этом случае трудно определить, с чем связано уменьшение флуоресцентного сигнала при проточной цитометрии — с уменьшенной концентрацией катиона или уменьшением размера клетки. Если же суммарная концентрация K и Na во внутриклеточной воде действительно уменьшалась, авторы имели дело с набухшими клетками, и говорить об апоптозе нельзя (см. «Приложение»).

Бортнер и Сидловский (Bortner, Cidlowski, 1999) исследовали содержание K в клетках Jurkat при апоптозе, вызванном антителами к anti-Fas-рецептору, используя калиевый флуоресцентный зонд, как в цитированной выше работе Хьюджеса и соавторов, проведенной на

timoцитах крысы. У клеток Jurkat, как и у тимоцитов, флуоресцентный сигнал, регистрируемый при проточной цитометрии, был меньше у клеток с меньшей интенсивностью малоуглового светорассеяния. Этот результат трактовался как уменьшение концентрации K в апоптозных клетках, хотя его можно было бы связывать и с уменьшением размеров клеток. Концентрацию Na авторы не определяли.

Наиболее близка к нашему исследованию по замыслу работа Бенсона и соавторов (Benson et al., 1996). На лимфоидных клетках СЕМ-С7А они вызывали апоптоз дексаметазоном и определяли параллельно внутриклеточное содержание воды изотопным методом, содержание K — пламенной фотометрией, объем клеток — электрическим измерителем Колтера и плавучую плотность клеток — в линейном градиенте Перколл. При действии испытанной концентрации дексаметазона (5 мкМ) апоптоз у клеток СЕМ-С7А развивался медленно. Через 24 ч уменьшение объема клеток по измерителю Колтера составляло около 15 %, уменьшение содержания K в расчете на клетку или белок — тоже 15 %, но изменения содержания воды и плавучей плотности клеток не улавливались. В связи с этим авторы считают, что уменьшение размеров клеток СЕМ-С7А при апоптозе, вызванном дексаметазоном, обусловлено не потерей воды по осмотическому механизму из-за уменьшения содержания осмолитов, а экзцитозом клеточных фрагментов. На более поздних стадиях апоптоза содержание воды по изотопным определениям достоверно уменьшалось, но плавучая плотность клеток при этом тоже уменьшалась, а не увеличивалась, как при апоптозе тимоцитов в наших опытах. Этот результат Бенсона и соавторов также трудно объяснить на основе простой осмотической модели. По-видимому, при определении внутриклеточного содержания K и воды у этих авторов была допущена какая-то ошибка, поскольку полученное ими значение концентрации K в расчете на внутриклеточную воду составляло 276—305 мМ. Это нереальная величина, так как она почти равна суммарной концентрации всех осмолитов в культуральной среде.

Подводя итог, необходимо отметить, что имеющиеся в литературе данные недостаточны для строгого доказательства роли K в апоптозном сокращении размеров клеток. Для этого нужно показать, что при апоптозе параллельно с изменением содержания воды в клетках уменьшается внутриклеточное содержание K в расчете на клетку, клеточный белок или сухую массу клетки. Уменьшение концентрации K в расчете на воду, сопровождающееся снижением суммарной концентрации K и Na, о котором сообщается во многих исследованиях, проведенных с использованием флуоресцентных зондов, указывает на набухание клеток, а набухание клеток — это признак, присущий, по определению, не апоптозу, а некрозу (Kerr, 1971).

Более убедительным свидетельством в пользу решающей роли снижения содержания K в уменьшении объема клеток при апоптозе являются данные рентгеновского микроанализа, когда они показывают, что уменьшается суммарное содержание K и Na в клетках в расчете на сухую массу. К сожалению, при рентгеновском микроанализе всегда недостает данных по внутриклеточному содержанию воды. Мы полагаем, что полученные в настоящей работе результаты более строго, чем у предшественников, показывают на примере тимо-

цитов крысы, что в уменьшении размеров клеток при апоптозе действительно ключевую роль может играть снижение внутриклеточного содержания К. Отметим, что на другом исследованном нами объекте, клетках U937, апоптоз которых вызывали этопозидом, ионные механизмы не играют существенной роли в уменьшении размеров клеток при апоптозе. Эти данные будут рассмотрены в следующем сообщении.

Приложение

Из условия осмотического баланса между клеткой и средой и электронейтральности внутриклеточной и внешней среды следуют два базовых уравнения, связывающих содержание воды в клетке (объем клетки, v), концентрацию однозарядных ионов в среде K_0 , Na_0 , Cl_0 , и клетке K_i , Na_i , Cl_i , количество в клетке непроникающих осмотиков A и их средний заряд z (Boyle, Conway, 1941).

$$K_i + Na_i - Cl_i + zA/v = 0;$$

$$K_i + Na_i + Cl_i + A/v = K_0 + Na_0 + Cl_0.$$

Эти уравнения должны выполняться независимо от того, каковы механизмы переноса однозарядных ионов через клеточную мембрану, и из них простым преобразованием получается формула, которая показывает, что уменьшение объема клетки всегда должно сопровождаться увеличением суммы внутриклеточных концентраций K_i и Na_i , поскольку из-за присутствия непроникающих анионов в клетке ($z < -1$) эта сумма всегда больше полусуммы наружных концентраций K_0 , Na_0 и Cl_0 (Веренинов, Веренинов, 1991):

$$v/A = \frac{z + 1}{(K_0^+ + Na_0^+ + Cl_0^-) - 2(K_i^+ + Na_i^+)}.$$

Хотя суммарная концентрация K_i и Na_i при уменьшении объема клетки увеличивается, суммарное содержание катионов падает, из-за того что уменьшение объема перекрывает увеличение концентрации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 01-04-49111 и РФФИ—ННИО 98-04125).

Список литературы

- Бернет Ф. 1971. Клеточная иммунология. М.: Мир. 542 с.
- Веренинов А. А., ст., Веренинов А. А., мл. 1991. Ионный, электрический и водный баланс в животной клетке. Система с активным транспортом катионов, гольдмановскими каналами и симпортом типа $Na + K + 2Cl$. Цитология. 33 (11): 4—17.
- Жербин Е. А., Хансон К. П., Решиков А. М., Сунгузов А. Ю., Чухловин А. Б. 1982. Разделение популяции тимоцитов крысы в градиенте фикола-пака. I. Связь плавучей плотности клеток с их биологическими параметрами. Цитология. 24 (6): 699—703.
- 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.
- Barbiero G., Duranti F., Bonelli G., Amenta J. S., Baccino F. M. 1995. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. Exp. Cell Res. 217: 410—418.
- Benson R. S., Heer S., Dive C., Watson A. J. 1996. Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. Amer. J. Physiol. 270: 1190—1203.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 1999. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. J. Biol. Chem. 274: 21 953—21 962.
- Boyle P. J., Conway E. H. 1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. J. Physiol. 100: 1—63.
- Cohen G. M., Sun X.-M., Snowden R. T., Ormerod M. G., Dinsdale D. 1993. Identification of a transitional preapoptotic population of thymocytes. J. Immunol. 151: 566—574.
- Dallaparta B., Hirsch T., Susin S. A., Zamzami N., Larochette N., Brenner C., Marzo I., Kroemer G. 1998. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. J. Immunol. 160: 5605—5615.
- Fernández-Segura E., Cañizares F. J., Cubero M. A., Warley A., Campos A. 1999. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. Exp. Cell Res. 253: 454—462.
- Gómez-Angelats M., Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2000. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. Cell Tissue Res. 301: 33—42.
- 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: 30 567—30 576.
- Hughes F. M., Jr., Cidlowski J. A. 1998. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis: protease-dependent activation of cell shrinkage and DNA degradation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 65: 207—217.
- Kerr J. F. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J. Pathol. 105: 13—20.
- Lang F., Lepple-Wienhues A., Paulmichl M., Szabo I., Siemen D., Gulbins E. 1998. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. Cell. Physiol. Biochem. 8: 285—292.
- Lang F., Ritter M., Gamper N., Huber S., Fillon S., Tanner V., Lepple-Wienhues A., Szabo I., Gulbins E. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. Cell. Physiol. Biochem. 10: 417—428.
- Lang F., Uhlemann A. C., Lepple-Wienhues A., Szabo I., Siemen D., Nilius B., Gulbins E. 1999. Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. Herz. 24: 232—235.
- Lichtman M. A., Jackson A. H., Peck W. A. 1972. Lymphocyte monovalent cation metabolism: cell volume, cation content and cation transport. J. Cell. Physiol. 80: 383—396.
- Lonskaya I. A., Volgareva E. V., Rozanov Y. M. 2001. Two different types of apoptosis in thymocytes. Цитология. 43 (3): 244—249.
- 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. Nat. Acad. Sci. USA. 97: 9487—9492.
- 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.
- Montague J. W., Bortner C. D., Hughes F. M., Jr., Cidlowski J. A. 1999. A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. Steroids. 64: 563—569.
- Offen D., Ziv I., Gorodin S., Barzilai A., Malik Z., Melamed E. 1995. Dopamine-induced programmed cell death in mouse thymocytes. Biochim. biophys. acta. 1268: 171—177.
- Ohyama H., Yamada T., Watanabe I. 1981. Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes. Radiat. Res. 85: 333—339.
- 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.

Orlov S. N., Thorin-Trescases N., Kotelevtsev S. V., Tremblay J., Hamet P. 1999. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J. Biol. Chem.* 274 : 16 545—16 552.

Ormerod M. G., Sun X. M., Snowden R. T., Davies R., Fearhead H., Cohen G. M. 1993. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. *Cytometry*, 14 : 595—602.

Salido M., Vilches J., Lopez A., Roomans G. M. 2001. X-ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line. *Cell Biol. Int.* 25 : 499—508.

Shortman K. 1971. The density distribution of thymus, thoracic duct and spleen lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 77 : 319—330.

Skepper J. N., Karydis I., Garnett M. R., Hegyi L., Hardwick S. J., Warley A., Mitchinson M. J., Cary N. R. 1999. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. *J. Pathol.* 188 : 100—106.

Thomas N., Bell P. A. 1981. Glucocorticoid-induced cell-size changes and nuclear fragility in rat thymocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22 : 71—84.

Wyllie A. H., Morris R. G. 1982. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Amer. J. Pathol.* 109 : 78—87.

Yamada T., Ohyama H. 1980. Separation of the dead cell fraction from X-irradiated rat thymocyte suspensions by density gradient centrifugation. *Int. J. Radiat. Biol.* 37 : 695—699.

Yamada T., Ohyama H. 1988. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol.* 53 : 65—75.

Yu S. P., Canzoniero L. M., Choi D. W. 2001. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 : 405—411.

Поступила 26 XII 2002

WATER AND ION BALANCE IN RAT THYMOCYTES UNDER APOPTOSIS INDUCED WITH DEXAMETHASONE OR ETOPOSIDE. OSMOTIC CELL VOLUME DECREASE

A. A. Vereninov,¹ E. V. Volgareva, V. V. Matveev, A. V. Moshkov, Yu. M. Rosanov, A. V. Shirokova, V. E. Yurinskaya

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: veren@mail.cytspb.rssi.ru

Cell ion and water balance was studied with respect to analysis of the osmotic model of apoptotic volume decrease (AVD) in rat thymocytes under dexamethasone (1 μM , 4—6 h) or etoposide (50 μM , 5 h) treatment. Intracellular water content was determined by measurement of cell buoyant density in continuous Percoll gradient, while intracellular potassium and sodium contents were determined by flame emission analysis. Apoptosis was verified by an increase in cell buoyant density, fluorescence of cells stained with Acridine orange and Ethidium bromide (flow cytometry), by changes in the cell cycle and the appearance of sub-diploid peak in the DNA histogram (flow cytometry), and by a decrease in cell size examined with light microscope. A separate fraction of dense cells with reduced size was found to appear after dexamethasone or etoposide treatment. This fraction was considered as apoptotic. An increase in buoyant density of apoptotic cells corresponded to a decrease in cell water content. In apoptotic cells vs. cells with normal buoyant density, the intracellular potassium content was lower, but sodium content was higher. The sum of potassium and sodium contents was lower in apoptotic cells. Taken into account the loss of anions, associated with the loss of cations, the bulk decrease in ions content has been sufficient to be accounted for cell volume decrease on the basis of the ion-osmotic model.

Key words: apoptosis, thymocytes, cell potassium, cell sodium, cell water, dexametasone, etoposide.