

С.Д. Загородняя, Г.В. Баранова, Н.В. Нестерова

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина*

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА И ЭТОПОЗИДА НА ПРОЦЕСС СД95-ОПОСРЕДОВАННОГО АПОПТОЗА В ВЭБ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИМФОМНЫХ КЛЕТКАХ BL-41 И DG-75

Целью работы было изучение влияния противоопухолевых препаратов на процесс CD95-опосредованного апоптоза в клетках BL-41 и DG-75, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр.

Проведены исследования по влиянию противоопухолевых препаратов «Doxorubicin» «Ebewe» и «Veresid (Etoposide)» на процесс апоптоза в клетках, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр с использованием цитоморфологических методов, спектрофотометри и ПЦР.

Влияние исследуемых препаратов на культуру клеток было оценено вычислением CC50. Показано, что он составлял 20 мкг/мл, как для этопозида, так и в случае доксорубина для линии клеток DG-75. BL-41 клетки были более чувствительны к исследуемым препаратам. CC50 составлял 5 мкг/мл. ПЦР методом показано, что в исследуемых клеточных линиях идет активное накопление ДНК ВЭБ. В системе DG 75 + EBV доксорубин в концентрации 20 мкг/мл вызывал апоптоз в 89 % клеток через 24 часа после инфекции, при этом этопозид-индуцированный апоптоз составлял 35% клеток. Культура клеток BL -41 чувствительна в равной степени к обоим препаратам. При этом в системе суперинфицированные ВЭБ клетки + доксорубин выявлялось только 10% апоптических клеток.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии вирусной инфекции на чувствительность лимфомных клеток BL-41 и DG-75 к исследуемым противоопухолевым препаратам.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирус Эпштейна-Барр, CD 95-опосредованный апоптоз.

Гомеостаз между клеточными процессами пролиферации и смерти имеет крайнюю важность для мультиклеточного организма. Апоптоз – важный регуляторный механизм, посредством которого нежелательные клетки могут быть элиминированы в течение нормального развития, либо из-за излишка клеток, что представляет угрозу для организма. Как, например, в случае вирусинфицированных клеток.

Таким образом, апоптоз защищает организм от рака, вирусных инфекций и поддерживает гомеостаз через ряд физиологических стимулов. Сбой апоптоза могут приводить к заболеваниям, ассоциированным с повышением количества клеток определённого типа, например, аутоиммунити или рака. Разные типы клеток реагируют на разные типы посредников и подвластны разным путям программирования клеточной гибели. Клеточные изменения, которые наблюдаются при апоптозе, включают сжатие клетки, конденсацию хроматина, пузырение цитоплазмы, образование апоптических телец, интрануклеосомальную фрагментацию хромосомальной ДНК, что часто служит биохимическими маркерами идентификации апоптоза. Апоптические тельца и клетки, как правило, фагоцитируются. Апоптоз используется иммунной системой для элиминации потенциально опасных клеток, например, вирусинфицированных. Стремительная гибель последних снижает распространение вируса. Иммуноопосредованный путь апоптоза инициируется на клеточной мембране, посредством взаимодействия FAS-(APO-1/CD95) или TNFR1- и TNFR2-трансмембранных рецепторов (рецепторов смерти) с подобными экстраклеточными лигандами – FAS-лигандами (FASL), которые экспрессируются активированными T- или NK-клетками, и TNF (факторами некроза опухоли), соответственно. Вирусы имеют способность коэволюционировать вместе со своим хозяином, что даёт им возможность перехитрить собственную детекцию и деструкцию хозяином. Они могут захватывать и пользоваться преимущественно белками хозяина, настраивать клеточные процессы на

интенсивность собственной репликации и распространения. Литическая инфекция вируса Эпштейна-Барр вызывает апоптоз. Экспрессия BHRF1 (гомолога bcl-2) при ранней инфекции предотвращает TNF- и FAS-опосредованный апоптоз, с целью формирования максимального количества вирусных частиц. BHRF1, также, способен блокировать апоптоз в эпителиальных клетках, вызванный γ -излучением и химиотерапией. Также, для него характерный альтернативный тип механизма мультиустойчивости к химиопрепаратам. Латентный мембранный белок 1 (LMP1), онкоген ВЭБ, ослабляет регуляцию p53, усиливает экспрессию клеточных антиапоптотических генов bcl-2- и A20 [3, 4, 5]. Это предотвращает p53-опосредованный апоптоз и является частью механизма трансформации В-клеток ВЭБ. LMP1, также, может способствовать установлению латентности инфекции. Данный вирус кодирует полипептиды EBNA-5 и BZLF-1, которые способны связываться с p53. EBNA-5 способен стимулировать прогрессию клеточного цикла. BZLF-1 связывается с p53 в конкретном регионе, подобно как у аденовирусов E4ORF6, и супрессирует p53-транскрипционную трансактивацию. Специфические функции BZLF-1, скорей всего, регулируют преобладание вирусного литического пути [6–8].

Целью нашей работы было изучение влияния противоопухолевых препаратов на процесс CD95-опосредованного апоптоза в клетках BL-41 и DG-75, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр. Анализ различных аспектов апоптоза важен не только с теоретической точки зрения, поскольку недавние данные подтвердили тесную связь между ответом апоптотических клеток и чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам в случаях ответа опухолевых клеток на химиотерапию.

Материалы и методы. *Культура клеток.* Были использованы культуры перевиваемых клеток: V95-8 - В-лимфоциты периферической крови обезьян-мармазеток, которые трансформированы вирусом Эпштейна-Барр и хронически продуцирующие вирус; DG-75 и BL-41 – клетки из лимфомы Беркитта, которые не содержат геном вируса Эпштейна-Барр. Режим культивирования и состав среды отвечали рекомендациям [1].

Вирус. Для получения ВЭБ была использована клеточная линия V95-8. Культивирование проводили на протяжении 10 суток без добавления ростовой среды с использованием ТФА (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) («Sigma», США), добавление которого приводит к стимулированию пролиферации лимфоцитов и соответственно увеличению накопления вирусного материала. Путем дифференциального центрифугирования в ступенчатом градиенте декстрана (5-30%) было проведена очистка вируса. Полученные препараты ВЭБ в алликвотах хранились при -50°C .

Исследуемые препараты и моноклональные антитела.

В работе были использованы коммерческие препараты «Doxorubicin» «Ebewe» (producer: EBWE Arzneimittel Ges.m.b.H, Austria) и «Vepesid (Etoposide)» (producer: Titolare A.I.C.: Bristol Italiana S.p.A).

В качестве индуцирующего апоптоз агента были использованы мышинные мкАт к поверхностным антигенам дифференцированных лейкоцитов человека – МкАт к Сд95/Fas/АРО-антигену клон (IPO-4), которые были любезно предоставлены С.П. Сидоренко (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАНУ).

Определение пролиферативной активности клеток.

Методом окрашивания МТТ (3,(4,5-диметилтиазол-2-ил)-дифенилтетразолиум бромид) определяли пролиферативную активность клеток. Этот метод базируется на способности дегидрогеназной системы митохондрий клеток перерабатывать искусственный субстрат МТТ в формазан, с последующей детекцией сектрофотометрически. Проведение анализа соответствовало.

Плимеразная цепная реакция (ПЦР). Геном вируса Эпштейна-Барр в исследуемых клеточных линиях выявляли методом ПЦР, используя систему «АмплиСенс-100-R» (Россия). Метод включает стадию выделения ДНК фенольной экстракцией, депротеинизацию фенол/хлороформом с последующим осаждением ДНК этанолом. Праймером служил ген белка VCA ВЭБ размером 290 н.п. Анализ проводили согласно инструкции к тест-системе. Амплифицированный специфический фрагмент ДНК выявляли методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. После окон-

чания электрофореза гель переносили на стекло трансиллюминатора с последующим выявлением полос в ультрафиолетовом свете. Регистрация полученных данных проводилась с помощью компьютерной программы.

Цитоморфологический метод выявления апоптических клеток. Был использован Hoechst 33342, который является ДНК-тропным красителем. Он соединяется с ДНК в местах А-Г-пар и дает возможность выявлять апоптические клетки уже через 6-8 часов после того, как они получили апоптический стимул. Клетки в плотности 5×10^5 отмывали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) путем центрифугирования при 1500 об/мин. 5 мин. Осадок суспендировали в 100 мкл. раствора Hoechst 333422 в конечном разведении 0,1 мг/мл. инкубировали 30 минут при 37°C . Отмытые в ЗФР клетки помещали в 50 % раствор глицерина с 4 % параформальдегидом. Препараты наносили на предметные стекла, накрывали покровными и запаивали парафином. Подсчет клеток с апоптическими проявлениями проводили в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (Россия) при увеличении $\times 900$.

Результаты и их обсуждение. Для определения уровня репродукции ВЭБ в исследуемых линиях был использован метод полимеразной цепной реакции. Из результата анализа, представленного на рисунке, видно, что клетки DG-75, BL-41 в контроле не содержат геном ВЭБ, а после инфицирования уровень геномных эквивалентов увеличивается в три и шесть раз соответственно. Таким образом, показано, что в исследуемых клеточных линиях идет активное накопление ДНК вируса Эпштейна-Барр.

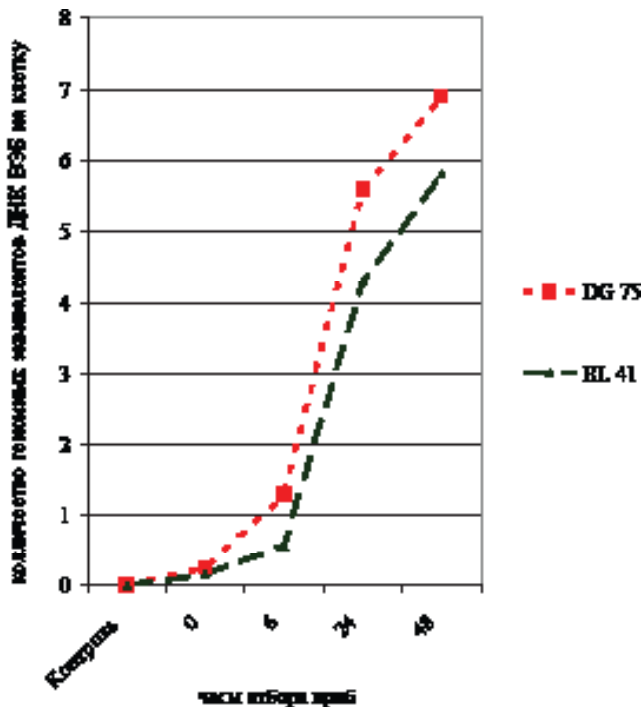


Рисунок. Динамика накопления ДНК ВЭБ в клетках BL-41 и DG-75

Влияние исследуемых препаратов было оценено вычислением индекса выживаемости (ЦПД_{50}), используя МТТ метод. Показано, что он составлял 20 мкг/мл, как для этопозида, так и в случае доксорубина для линии клеток DG-75. BL-41 клетки были более чувствительны к исследуемым препаратам: ЦПД_{50} составлял 5 мкг/мл.

Для изучения влияния вирусной инфекции на апоптоз в индуцированных противоопухолевыми препаратами доксорубином и этопозидом лимфомных клетках BL-41 и DG-75 был использован метод окрашивания Hoechst 33342. Результаты представлены в табл. 1 и 2, соответственно. Выявлено, что культура клеток BL-41 является более чувствительной к доксорубину, где препарат в концентрации 0,5 мкг/мл

приводит к проявлению апоптических признаков в 20 % клеточной популяции, против 6 % в той же концентрации этопозид. При внесении препаратов в инфицированную вирусом Эпштейна-Барр культуру BL-41 наблюдается обратный эффект. При внесении доксорубина до 1 мкг/мл апоптические проявления детектируются в менее чем 10 % клеток, при этом данные проявления при внесении этопозид в концентрации 0,5 мкг/мл регистрируются в 34 %. Вводя в культуру клеток BL-41 индуцирующий апоптоз агент мкАт к CD95 рецептору показано, что 0,5 мкг/мл доксорубина приводит к апоптозу 70 % клеточной популяции, этопозид только 47 %. В концентрации 1-5 мкг/мл результаты совпадают по обоим препаратам. Включая в систему BL-41+ВЭБ мкАт, повышает чувствительность культуры к доксорубину.

Анализируя влияние исследуемых веществ на культуру клеток DG-75 наблюдается аналогичная клеткам BL-41 большая чувствительность к доксорубину в динамике концентраций, но в варианте внесения препаратов в инфицированную ВЭБ культуру процент клеток с апоптическими проявлениями выше при внесении доксорубина, а именно, больше, чем в два раза при внесении этопозид во всех концентрациях. Обработка культуры клеток DG-75 мкАт к CD95 рецептору незначительно влияет на апоптоз клеток в варианте с доксорубином и повышает на 50 % количество апоптических клеток при добавлении этопозид в сравнении с клетками необработанными мкАт. Рассматривая систему DG-75+ВЭБ+мкАт следует отметить снижение чувствительности клеток к доксорубину в низких концентрациях 1-10 мкг/мл и обратный эффект в варианте с этопозидом.

Таблица 1

Влияние вируса Эпштейна-Барр на процесс CD95-опосредованного апоптоза в клеточной линии DG-75 под действием противоопухолевых препаратов доксорубина и этопозид

Вариант эксперимента	Количество апоптических клеток (в процентах) в часы отбора проб при инфицировании вирусом или с мкАт				
	3 h	24 h		3 h	24 h
DG 75	11	2	DG 75	11	2
Доксорубин 1 µg/ml	18	5	Этопозид 1 µg/ml	16	
Доксорубин 5 µg/ml	31	13	Этопозид 5 µg/ml	35	6
Доксорубин 10 µg/ml	17	45	Этопозид 10 µg/ml	42	10
Доксорубин 15 µg/ml	8	43	Этопозид 15 µg/ml	40	12
Доксорубин 20 µg/ml	32	40	Этопозид 20 µg/ml	26	19
DG 75 +мкАт	18	18	DG 75 +мкАт	18	18
Доксорубин 1 µg/ml	30	16	Этопозид 1 µg/ml	8	15
Доксорубин 5 µg/ml	25	40	Этопозид 5 µg/ml	18	17
Доксорубин 10 µg/ml	12	38	Этопозид 10 µg/ml	17	28
Доксорубин 15 µg/ml	14	44	Этопозид 15 µg/ml	26	30
Доксорубин 20 µg/ml	35	59	Этопозид 20 µg/ml	45	44
DG75 +ВЭБ	18		DG75 +ВЭБ	18	
Доксорубин 1 µg/ml	18	11	Этопозид 1 µg/ml	32	7
Доксорубин 5 µg/ml		17	Этопозид 5 µg/ml	46	8
Доксорубин 10 µg/ml	44	11	Этопозид 10 µg/ml	20	5
Доксорубин 15 µg/ml	35	62	Этопозид 15 µg/ml	42	25
Доксорубин 20 µg/ml	55	89	Этопозид 20 µg/ml	66	35
DG 75 +ВЭБ +мкАт	8	18	DG 75 +EBV +мкАт	8	18
Доксорубин 1 µg/ml	7	13	Этопозид 1 µg/ml	20	8
Доксорубин 5 µg/ml	4	20	Этопозид 5 µg/ml	23	35
Доксорубин 10 µg/ml	17	22	Этопозид 10 µg/ml	36	42
Доксорубин 15 µg/ml	32	68	Этопозид 15 µg/ml	24	45
Доксорубин 20 µg/ml	37	74	Этопозид 20 µg/ml	52	78

**Влияние вируса Эпштейна-Барр на процесс CD95-опосредованного апоптоза
в клеточной линии BL 41 под действием противоопухолевых препаратов
доксорубин и этопозид**

Вариант эксперимента	Количество апоптических клеток (в процентах) в часы отбора проб при инфицировании вирусом или с мкАт		
	24 h		24 h
BL 41	8	BL 41	8
Доксорубин 0.5 µg/ml	20	Этопозид 0.5 µg/ml	6
Доксорубин 1 µg/ml	29	Этопозид 1 µg/ml	21
Доксорубин 5 µg/ml	78	Этопозид 5 µg/ml	85
BL 41 + мкАт	28	BL 41 + мкАт	28
Доксорубин 0.5 µg/ml	70	Этопозид 0.5 µg/ml	47
Доксорубин 1 µg/ml	71	Этопозид 1 µg/ml	74
Доксорубин 5 µg/ml	86	Этопозид 5 µg/ml	89
DG75 +ВЭБ	6	DG75 +ВЭБ	6
Доксорубин 0.5 µg/ml	6	Этопозид 0.5 µg/ml	34
Доксорубин 1 µg/ml	9	Этопозид 1 µg/ml	79
Доксорубин 5 µg/ml	75	Этопозид 5 µg/ml	80
BL 41 +ВЭБ + мкАт	23	BL 41 +ВЭБ + мкАт	23
Доксорубин 0.5 µg/ml	31	Этопозид 0.5 µg/ml	15
Доксорубин 1 µg/ml	85	Этопозид 1 µg/ml	58
Доксорубин 5 µg/ml	88	Этопозид 5 µg/ml	79

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о большей чувствительности обеих клеточных линий к доксорубину, включая вариант дополнительной обработки МкАт к CD95 рецептору. Инфицированные ВЭБ культуры клеток по-разному реагируют на исследуемые вещества: BL-41 более чувствительна к этопозиду, DG-75 – к доксорубину. А при внесении в систему клетка-вирус-препарат МкАт наблюдается обратная закономерность. Полученные данные свидетельствуют о влиянии вирусной инфекции на чувствительность лимфомных клеток BL-41 и DG-75 к исследуемым противоопухолевым препаратам, что может быть обусловлено различными механизмами действия доксорубина и этопозид, ограничивающие в той или иной мере репликативный механизм ВЭБ-инфекции [9].

Таким образом, изучено влияние доксорубина и этопозид на процесс CD95-опосредованного апоптоза в инфицированных ВЭБ лимфомных клетках BL-41 и DG-75.

Загородня С.Д., Баранова Г.В., Нестерова Н.В.

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**ВПЛИВ ДОКСОРУБІНИНУ І ЕТОПОЗИДУ НА ПРОЦЕС
CD 95-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО АПОПТОЗУ У ВЕБ-ІНФІКОВАНИХ
ЛІМФОМНИХ КЛІТИНАХ BL-41 І DG-75**

Резюме

Метою роботи було вивчення впливу протипухлинних препаратів на процес CD95-опосередованого апоптозу в клітинах BL-41 і DG-75, інфікованих вірусом Епштейна-Барр.

Проведено дослідження щодо впливу протипухлинних препаратів «Doxorubicin» «Ebewe» і «Vepesid (Etoposide)» на процес апоптозу в клітинах, інфікованих вірусом Епштейна-Барр з використанням цитоморфологічних методів, спектрофотометрії і ПЛР.

Вплив досліджуваних препаратів на культуру клітин було оцінено обчисленням CC_{50} . Показано, що він становив 20 мкг/мл як для этопозиду, так і у випадку доксорубініну для лінії клітин DG-75. BL-41 клітини були більш чутливі до досліджуваних препаратів. CC_{50} становив 5 мкг/мл. ПЛР методом показано, що в досліджуваних лініях клітин йде активне накопичення ДНК ВЕБ. В системі DG 75 + EBV доксорубінін в концентрації 20 мкг/мл викликав апоптоз у

89 % клітин через 24 години після інфекції, при цьому етопозид-індукований апоптоз становив 35 % клітин. Культура клітин BL-41 однаково чутлива до обох препаратів. При цьому в системі суперінфікованих ВЕБ клітин + доксорубіцин виявлялося тільки 10% апоптичних клітин.

Отримані дані свідчать про вплив вірусної інфекції на чутливість лімфомних клітин BL-41 і DG-75 до досліджуваних протипухлинних препаратів.

Ключові слова: вірус Епштейна-Барр, CD 95-опосередкований апоптоз.

Zagorodnya S.D., Baranova G.V., Nesterova N.V.

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv

**INFLUENCE OF DOXORUBICIN AND ETOPOSIDE ON THE
CD 95 MEDIATED APOPTOSIS IN EBV INFECTED LYMPHOMA
CELLS BL-41 AND DG-75**

S u m m a r y

The aim of work was to study the effect of anticancer drugs on the process of CD 95 mediated apoptosis in BL-41 and DG-75 infected with Epstein-Barr virus.

Studies of the effect of anticancer drugs «Doxorubicin» «Ebewe» and «Vepesid» (Etoposide) on the apoptosis in EBV infected cells using cytomorphological methods, spectrophotometry and PCR carried out.

The influence of the tested drugs in cell culture was assessed by calculating the CC_{50} . It was shown that it was 20 $\mu\text{g/ml}$ both for Etoposide and for Doxorubicin in the case of cell line DG-75. BL-41 cells were more sensitive to the tested drugs. CC_{50} was 5 $\mu\text{g/ml}$. PCR method showed that in the studied cell lines active accumulation of EBV DNA took place. In 24 hours after infection in the DG 75 + EBV system 20 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin provoked apoptosis in 89% of cells, and Etoposide-induced apoptosis was 35%. Cell culture BL -41 was equally sensitive to both drugs. At the same time, in the EBV super infected cells + Doxorubicin only 10% of apoptotic cells were detected.

The obtained data prove the impact of viral infection on the sensitivity of lymphoma cells BL-41 and DG-75 to tested anticancer drugs.

Key words: Epstein-Barr virus, CD-95-mediated apoptosis.

1. Уоллз Э., Крофорд Д. Культивирование клеток В95-8 // Лимфоциты. Методы. – М: Мир, 1990. – С. 230-249.
2. Anne Roulston, Richard C. Marcellus, and Philip E. Branton. Viruses and Apoptosis // Annu. Rev. Microbiol. – 1999. – 53. – P. 577-628.
3. Cherney BW, Sgadari C, Kanegane C et al. Expression of the Epstein-Barr virus protein LMP1 mediates tumor regression in vivo // Blood. 1998 Apr 1; 91(7): 2491-500.
4. Ingrid K. Ruf, Paul W. Rhyne, Hui Yang, Corina M. Borza et al. Epstein-Barr Virus Regulates c-MYC, Apoptosis, and Tumorigenicity in Burkitt Lymphoma. // Molecular and Cellular Biology, March 1999, p. 1651-1660, Vol. 19, No. 3
5. Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, et.al. Expression cloning of a cDNA encoding a tetinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. – Cell, 1992, 70 (2), p.351-364.
6. Klein G. Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. //Cell. – 1989. – Vol.58. – P. 5-8.
7. Marshall S. Horwitz. Adenovirus immunoregulatory genes and their Cellular Targets// Virology. – 2001. – 279. – P. 1-8.
8. McCarthy NJ, Hazlewood SA, Huen DS, Rickinson AB, Williams GT. The Epstein-Barr virus gene BHRF1, a homologue of the cellular oncogene Bcl-2, inhibits apoptosis induced by gamma radiation and chemotherapeutic drugs. Adv Exp Med Biol. 1996; 406:83-97.
9. Thomas Wieder, Frank Essmann, Aram Prokop, Karin Schmelz, Klaus Schulze-Osthoff, Rudi Beyaert, Bernd Dörken, and Peter T. Daniel. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3 Blood, 1 March 2001, Vol. 97, No. 5, pp. 1378-1387.

Отримано 13.06.2014