

А. В. Головань, С. Д. Загородня, Н. В. Нестерова

Вивчення апоптозстимулюючого впливу похідних ізонікотинової кислоти на моделях латентної та гострої ВЕБ інфекцій

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

Сучасною стратегією терапії вірусних захворювань, особливо вірусіндукованих пухлинних новоутворень, є пошук індукторів апоптозу, які б діяли на один чи декілька етапів апоптотичного процесу. Досліджено здатність похідних ізонікотинової кислоти стимулювати апоптоз у лімфобластоїдних клітинах Raji на фоні інфекції вірусом Епштейна–Барр. Показано, що йодмісна сполука ПВ-1 інгібує експресію білка Bcl-2 через 48 год в інфікованих вірусом клітинах, тобто при розвитку літтичної інфекції. Сполука ПВ-2 індуктує незначне зниження рівня експресії білка Bcl-2 на ранній точці, однак таке зниження не пов'язано з вірусною інфекцією, а пояснюється впливом речовини безпосередньо на процеси клітинного апоптозу. Суміш сполук ПВ-1 і ПВ-2 (речовина ПВ-10) викликає пролонговане інгібування експресії білка Bcl-2 в вірусінфікованих клітинах, що свідчить про залучення механізмів індукції апоптозу, пов'язаних з репродукцією вірусу. Таким чином, дані сполуки є ефективними при розвитку гострої літтичної інфекції і можуть запобігати переходу інфекції в латентний стан за рахунок індукції процесів апоптозу.

Гомеостаз організму підтримується балансом між загибеллю та поділом клітини. Порушення регуляції механізмів загибелі клітин спричинює різні види захворювання. Віруси мають здатність уникати розвитку апоптотичного процесу в інфікованих клітинах. Для цього у вірусному геномі закодовані інгібіторні білки, які блокують один із ключових регуляторних елементів апоптозу. Наприклад, у геномі вірусу Епштейна–Барр (ВЕБ) закодовано білок VHRF-1, який є структурним та функціональним гомологом клітинного білка Bcl-2 і може блокувати апоптоз, індукований рецепторами смерті, нестачею факторів росту, гранзимом В, дерегуляцією с-мус та р53. Продукт вірусного гена LMP-1 може підвищувати експресію Bcl-2, що призводить до вірусної латентності та необмеженого поділу клітин. Сучасною стратегією терапії вірусних захворювань, особливо вірусіндукованих пухлинних новоутворень, є пошук індукторів апоптозу, які б діяли на один чи декілька етапів апоптотичного процесу [1, 2].

4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид — це нестероїдний протизапальний препарат, який, крім протизапальної дії, має виражену інтерферогенну та антивірусну дію і не виявляє значних побічних ефектів по відношенню до організму [3–5]. Показано здатність нестероїдних протизапальних препаратів, таких як ібупрофен та флурбіпрофен, викликати апоптоз в епітеліальних клітинах шлунка морських свинок [6].

Метою проведеного дослідження було вивчити здатність 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду і його похідних стимулювати апоптоз у лімфобластоїдних клітинах Raji на фоні ВЕБ інфекції та виявити зміни рівня експресії білка Bcl-2.

© А. В. Головань, С. Д. Загородня, Н. В. Нестерова, 2014

Матеріали та методи. *Культури клітин.* Культура клітин Raji — лімфобластоїдні клітини людини В-фенотипу з лімфоми Беркітта, які містять 50–60 копій геному ВЕБ в епісомній формі і експресують лише латентні вірусні білки. Клітини В95–8 — лейкоцити мавпи мармазетки, які трансформовані ВЕБ та продукують інфекційні вірусні частинки. Культури клітин отримані з банку культур Інституту вірусології ім. Д. І. Івановського РАМН (Москва). Культивування клітин та їх інфікування вірусним матеріалом, отриманим із супернатанту клітин В95–8, проводили за методикою Уоллза та Крофорда [7].

Досліджувані речовини. 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид (ПВ-1, м. м. 354) та його похідні: ПВ-2 (м. м. 235) — не містить молекулу йоду в своїй структурі та ПВ-10, що є сумішшю ПВ-1 та ПВ-2 у рівних співвідношеннях 1 : 1. Структурні формули досліджуваних речовин наведено в роботі [5]. Речовини вносили в концентрації 50 мкг/мл.

Виявлення апоптотичних клітин. Для визначення відсотка апоптотичних клітин за станом ядер клітини фарбували флуоресцентним барвником Hoechst 33 342 (“Sigma”, США) за методикою, відпрацьованою нами та описаною в роботі [8]. Визначення відсотка апоптотичних клітин за фрагментацією ДНК проводили за методикою, описаною в [9], з подальшим електрофоретним розділенням ДНК фрагментів у 1,5% агарозному гелі.

Проточна цитометрія. Клітини Raji, оброблені вірусом та досліджуваними сполуками, фіксували в 4% параформальдегіді з наступною обробкою 90% метанолом. Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла до Bcl-2 (“Sigma”, США) в розведенні 1 : 500. Вторинні антитіла, FITC-кон’юговані (“Sigma”, США), вносили в розведенні 1 : 100. Аналіз проводили за допомогою проточного цитометра COULTER EPICS XL (“Beckman”, США) з програмним забезпеченням SYSTEM II™. Отримані дані аналізували за допомогою програмного забезпечення FlowJo vX.0.6 (Tree Star Inc., США).

Статистична обробка результатів. Усі дослідження проводили в трьох повторах. Визначали середні значення і стандартні похибки. Різницю між середніми оцінювали за критерієм Фішера і вважали достовірною при $p \leq 0,05$ [10]. При аналізі результатів, отриманих у проточному цитометрі, статистичну обробку даних виконували в програмі FlowJo vX.0.6 (Tree Star Inc., США).

Результати та їх обговорення. Вплив досліджуваних речовин (50 мкг/мл) на розвиток апоптозу в інфікованих клітинах вивчали через 3, 24 та 48 год за станом ядерного апарату. Контролями в досліді були неінфіковані та інфіковані ВЕБ клітини, не оброблені речовинами. На ранній часовій точці кількість апоптотичних клітин становила 10% як у неінфікованих, так і в інфікованих вірусом клітинах (рис. 1, а). Через 24 та 48 год дії речовини ПВ-1 (рис. 1, а) даний показник у варіанті неінфікованих вірусом клітин знижувався до 7%, а у випадку інфікованих клітин збільшувався до 15%. Під впливом речовини ПВ-2 (див. рис. 1, б) кількість апоптотичних клітин у варіанті неінфікованих клітин становила 13% через 48 год культивування, що на 2% перевищує вихідний показник апоптозу (11%) у культурі клітин. Натомість в інфікованих клітинах кількість апоптотичних клітин знижувалася до 8%. Дослідження розвитку апоптозу при обробці клітин речовиною ПВ-10 (див. рис. 1, в) показало, що в неінфікованих клітинах кількість апоптотичних клітин залишалася на рівні 7–8% через 48 год (початковий рівень становив 8%), а у випадку інфікованих клітин цей показник зростав до 11 і 15% відповідно через 24 та 48 год експозиції.

Ще одним підходом для виявлення впливу речовин на стимулювання апоптозу в культурі клітин є визначення стану ДНК за допомогою горизонтального електрофорезу в агарозному гелі за утворенням “апоптотичної драбини” — фрагментів клітинної ДНК, які виникають під час апоптозу за рахунок міжнуклеосомної фрагментації ДНК. Електрофоре-

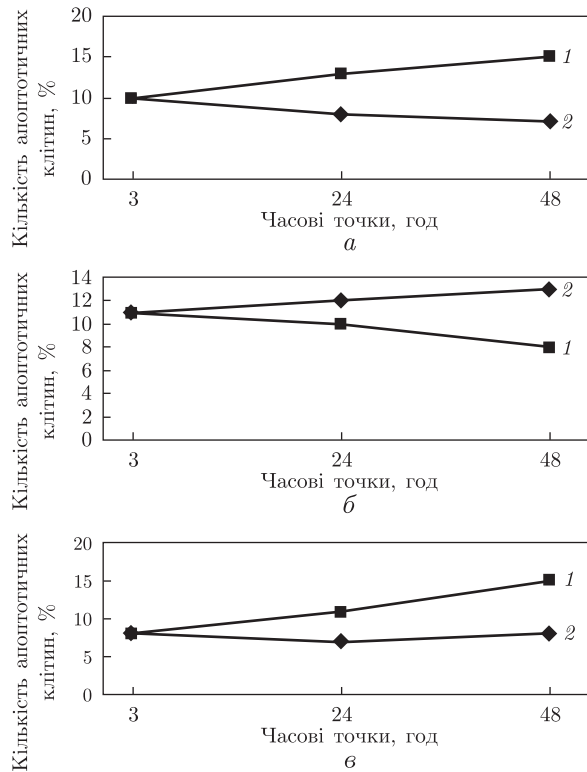


Рис. 1. Кількість апоптотичних клітин в інфікованих (1) та неінфікованих ВЕБ (2) культурах лімфобластоїдних клітин Раїї під дією 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду (ПВ-1) (а) та його похідних ПВ-2 (б) і ПВ-10 (в) у концентрації 50 мкг/мл. (Метод фарбування Hoescht 33342). На графіках наведено середні значення, стандартна похибка для яких $\leq 2\%$. Різниця між середніми є достовірною при $p \leq 0,05$. Кількість апоптотичних клітин у контролях не перевищувала 5%

тичне розділення ДНК досліджених зразків показало, що в контрольних зразках, не уражених вірусом, а також у зразках, інфікованих ВЕБ, без додавання досліджуваних речовин ДНК-фрагменти не утворюються (рис. 2, треки 1 і 2 відповідно). Апоптотичну драбину спостерігали в зразках неінфікованих та інфікованих клітин, оброблених речовинами ПВ-1 і ПВ-2, через 24 год (див. рис. 2, треки 3 і 4). Через 48 год ДНК-фрагменти спостерігали тільки в зразках з неінфікованими клітинами, обробленими речовиною ПВ-2.

Здатність досліджуваних речовин впливати на рівень експресії білка Vcl-2 в клітинах Раїї оцінювали через 3, 24 та 48 год. Як контрольні були використані клітини, неінфіковані та інфіковані ВЕБ і необроблені сполуками. Рівень експресії білка Vcl-2 проводили, порівнюючи отримані показники з відповідними контролями. Результати наведено на рис. 3 та в табл. 1. Під впливом ПВ-1 показник рівня експресії білка Vcl-2 змінювався на $\pm 6\%$ у неінфікованих клітинах у всіх часових точках. Натомість в інфікованих вірусом клітинах при дії ПВ-1 рівень експресії Vcl-2 протягом 24 год не змінювався, а на 48-й годині відмічено зменшення пулу Vcl-2 на 14%. Сполука ПВ-2 призводила до зменшення на 12% рівня білка Vcl-2 в клітинах, неінфікованих та інфікованих вірусом, вже через 3 год. На більш пізніх етапах пригнічення рівня експресії Vcl-2 під дією ПВ-2 не перевищувало 8%. Вплив сполуки ПВ-10 в інфікованих клітинах проявився у пригніченні на 15% рівня експресії білка Vcl-2 на 3-тю та 24-ту годину експозиції і на 23% — через 48 год, тоді як в неінфікованих клітинах під дією ПВ-10 даний показник варіював у межах $\pm 5\%$.

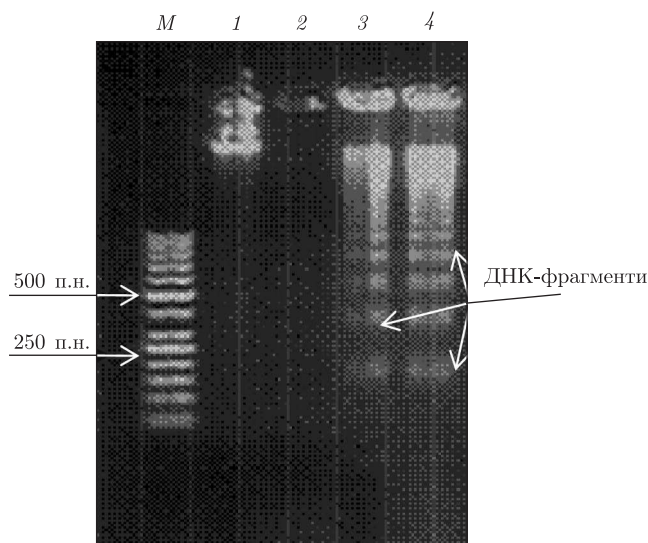


Рис. 2. Вплив 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду (ПВ-1) на фрагментацію ДНК в інфікованих та неінфікованих ВЕБ культурах лімфобластоїдних клітин Раї через 24 год. Електрофореграма ДНК в 1,5% агарозному гелі з “апоптотичною драбиною”. М – маркер; 1 – контроль клітин; 2 – клітини, інфіковані ВЕБ; 3 – клітини, оброблені ПВ-1 (50 мкг/мл); 4 – клітини, інфіковані ВЕБ і оброблені ПВ-1 (50 мкг/мл)

Попередні дослідження цитотоксичності та антиВЕБ активності досліджуваних сполук показали, що вони мають виражену антивірусну активність. Індекс селективності становив 8400 для ПВ-1, 400 та 440 для ПВ-2 та ПВ-10 відповідно [5].

У культурі клітини Раї експресуються латентні білки ВЕБ, зокрема білок LMP-1, який підсилює активність антиапоптотичного білка Bcl-2, що інгібує апоптоз [2]. Антиапоптотичні білки Bcl-2 та Bcl-xL знаходяться на зовнішній мітохондріальній мембрані у вигляді димерів, контролюючи проникність мітохондрій, пригнічують вивільнення цитохрому *c*. Проапоптотичні білки Bad, Bid, Bax та Bim можуть знаходитися в цитозолі та переміщуватися до мітохондрій і формувати проапоптотичний комплекс з Bcl-2 та Bcl-xL, що, у свою чергу, стимулює розвиток апоптозу по мітохондріальному шляху. Апоптоз асоціюється з активацією декількох нуклеаз, які розрізають ядерну ДНК спочатку на великі і потім послідовно на дуже маленькі фрагменти. Одним з наслідків ДНК фрагментації є незворотна деградація ДНК [1, 2].

Таблиця 1. Рівень експресії білка Bcl-2 в неінфікованих (ВЕБ–) та інфікованих вірусом Епштейна–Барр (ВЕБ+) клітинах Раї під дією 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду (ПВ-1) та його похідних ПВ-2 і ПВ-10 у концентрації 50 мкг/мл

Зразок	3 год		24 год		48 год	
	ВЕБ–	ВЕБ+	ВЕБ–	ВЕБ+	ВЕБ–	ВЕБ+
Контроль	80	80,3	72,2	78,2	77,1	84,5
Інгібування (–) і стимулювання (+) рівня Bcl-2, %						
ПВ-1	0	–3,5	–3	–5,5	+6,3	–14,3
ПВ-2	–12	–12	–4	–8,5	–5,5	–8
ПВ-10	–2	–15	+3,3	–14,5	–5	–23

Примітка. Наведені середні значення достовірні при $p \leq 0,05$. Стандартна похибка в усіх випадках $\leq 1,5\%$.

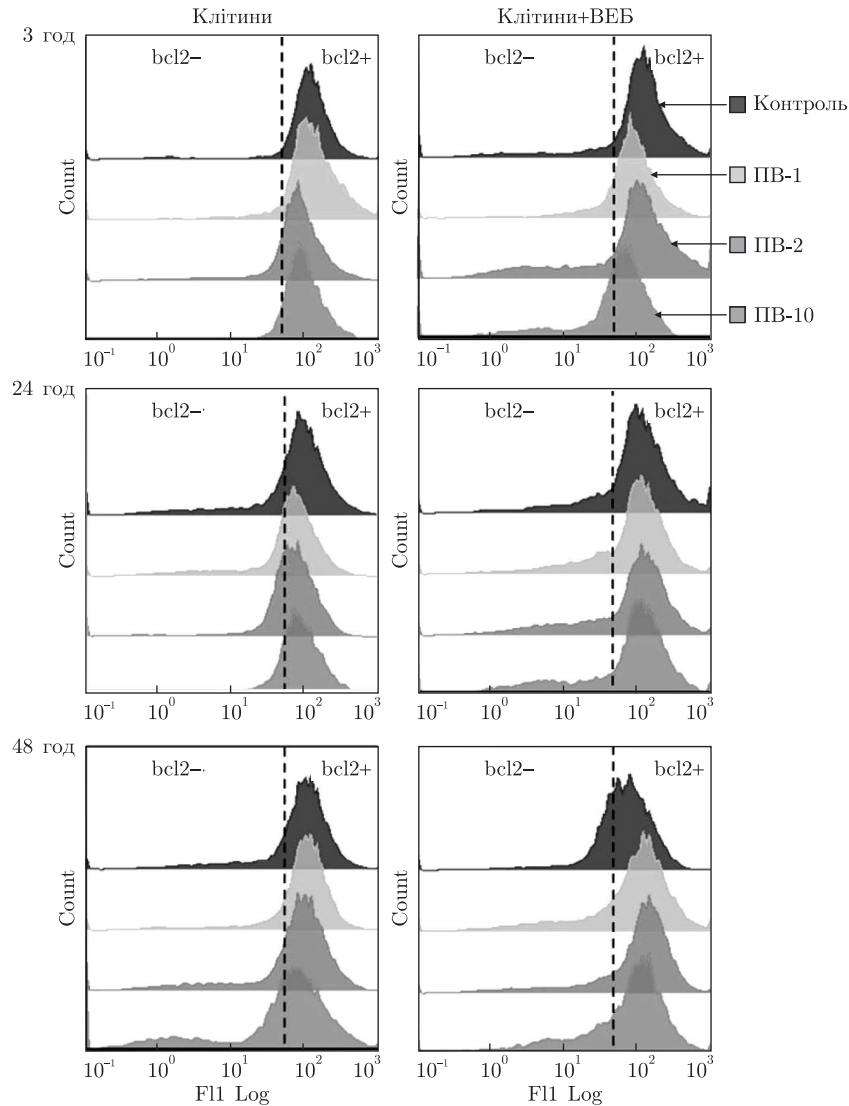


Рис. 3. Вплив досліджуваних речовин у концентрації 50 мкг/мл на рівень експресії білка Bcl-2 (проточна цитометрія)

У результаті проведених досліджень показано, що при вірусній інфекції до 24-ї години апоптотичний процес загибелі клітин під дією ПВ-1 відбувається не мітохондріальним шляхом, про що свідчать виявлені низькомолекулярні ДНК-фрагменти і незмінний рівень Bcl-2, тоді як на більш пізніх етапах (48 год) має місце індукція апоптозу із залученням мітохондріального механізму апоптозу. Дослідження впливу ПВ-2 на процеси синтезу Bcl-2 і стимуляцію апоптозу виявило, що ця сполука не викликає порушень ДНК при короткотривалій експозиції, проте спричиняє розчеплення ДНК на низькомолекулярні фрагменти через 24 та 48 год, що супроводжується розвитком апоптозу, але без зміни рівня експресії білка Bcl-2, тобто синтез даного білка відновлюється. Таким чином, можна припустити, що речовина ПВ-2 має апоптозстимулюючий вплив у культурі клітин, але в цьому процесі білок Bcl-2 не бере участі, тобто не відбувається залучення мітохондріального шляху. Встановлено, що ПВ-10 в інфікованих ВЕБ клітинах, на відміну від неінфікованих, че-

рез 24 та 48 год експозиції індукує формування високомолекулярних ДНК-фрагментів та знижує рівень Bcl-2 в інфікованих клітинах і не впливає на рівень даного антиапоптотичного білка в клітинах, не інфікованих ВЕБ. Отримані дані свідчать про те, що ПВ-10 може індукувати апоптоз по мітохондріальному шляху при вірусній інфекції. Можливо, що це пов'язано з тим, що Zta-транскрипт надраннього гена BZLF1 при літичній вірусній інфекції здатний зменшувати експресію антиапоптотичних білків Bcl-2 і Bcl-xL та індукувати апоптоз [2].

Комбінована терапія ВЕБ-інфекції, направлена на пригнічення репродукції вірусу та інгібування функціонування чи порушення взаємодії між антиапоптотичними білками родини Bcl-2, може забезпечити подвійний ефект при лікуванні ВЕБ-асоційованих захворювань. Проведені дослідження апоптозстимулюючого впливу похідних ізонікотинової кислоти свідчать про здатність досліджуваних речовин індукувати апоптоз у культурі клітин Raji як по мітохондріальному шляху із залученням білка Bcl-2, так і шляхом, що оминає залучення білка Bcl-2. Показано, що йодвісна сполука ПВ-1 інгібує експресію білка Bcl-2 через 48 год в інфікованих ВЕБ клітинах, тобто при розвитку літичної інфекції. Досліджувана концентрація на дану часову точку пригнічує репродукцію вірусу на 100%, можливо, що сполука інгібує синтез вірусних гомологів білка Bcl-2, а в неінфікованих клітинах не виявляє впливу, через відсутність додаткового джерела посилення експресії Bcl-2. Сполука ПВ-2 індукує незначне зниження рівня експресії білка Bcl-2 на ранній точці, що пов'язано не з вірусом, а її впливом на клітинні процеси. Речовина ПВ-10 викликає пролонговане інгібування експресії білка Bcl-2 у вірусінфікованих клітинах, що свідчить про залучення механізмів індукції апоптозу, пов'язаних з репродукцією вірусу, можливо, з експресією надранніх генів, які індукують апоптоз при літичній інфекції, блокуванням синтезу вірусних гомологів Bcl-2, ехансерів експресії Bcl-2, таких як LMP-1 та EBNA-2A [1, 2]. Тобто, дані сполуки ефективні при розвитку гострої літичної інфекції і, можливо, будуть запобігати переходу інфекції в латентний стан, адже індукція апоптозу є необхідною навіть на пізніх етапах літичної інфекції і тому інгібування апоптозу може бути критичним при переході в латентну фазу інфекції.

1. Solary E., Dubrez L., Eymen B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases // Eur. Respir. J. – 1996. – No 9. – P. 1293–1305.
2. Fu Q., He Ch., Mao Zh.-R. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl – 2 protein family and apoptosis in human tumor cells // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2013. – 14, No 1. – P. 8–24.
3. Бухтіарова Т. О., Даниленко В. П., Хоменко В. С. Сучасний нестероїдний протизапальний препарат та індуктор інтерферону амизон: перспективи застосування // Укр. мед. часопис. – 2003. – 33, № 1. – С. 72–74.
4. Фролов А. Ф., Фролов В. М., Лоскутова И. В. Амизон в химиотерапии больных с эпидемическим паротитом // Укр. химиотерапевт. журн. – 2000. – № 2. – С. 19–21.
5. Загородня С. Д., Нестерова Н. В., Даниленко В. П. та ін. Дія похідних ізонікотинової кислоти на репродукцію вірусу Епштейна–Барр // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, № 2. – С. 65–72.
6. Ashton M., Hanson P. J. Disparate effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on apoptosis in guinea-pig gastric mucous cells: inhibition of basal apoptosis by diclofenac // Br. J. Pharmacol. – 2002. – 135, No 2. – P. 407–416.
7. Уоллз Э., Крофорд Д. Культивирование клеток В95–8 // Лимфоциты. Методы. – Москва: Мир, 1990. – С. 230–249.
8. Загородня С. Д., Нестерова Н. В., Головань А. В. и др. АнтиВЭБ активность 6-азацитидина и его производных // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, № 6. – С. 41–49.
9. Herrmann M., Lorenz H.-M., Voll R. et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments // Nucl. Acids Res. – 1994. – 22, No 24. – P. 5506–5507.

10. Чекотовский Е. В. Графічний метод у статистиці на основі програми Excel. – Київ: Знання, 2000. – 518 с.

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

Надійшло до редакції 11.06.2013

А. В. Головань, С. Д. Загородняя, Н. В. Нестерова

Исследование апоптозстимулирующего влияния производных изоникотиновой кислоты на моделях латентной и острой ВЭБ инфекций

Современной стратегией терапии вирусных заболеваний, особенно вирусиндуцированных опухолевых новообразований, является поиск индукторов апоптоза, которые бы действовали на один или несколько этапов апоптотического процесса. Исследована способность производных изоникотиновой кислоты стимулировать апоптоз в лимфобластоидных клетках Raji на фоне инфекции вирусом Эпштейна–Барр. Показано, что йодсодержащее соединение ПВ-1 ингибирует экспрессию белка Bcl-2 через 48 ч в инфицированных вирусом клетках, т. е. при развитии литической инфекции. Вещество ПВ-2 индуцирует незначительное снижение уровня экспрессии белка Bcl-2 на ранней точке, однако такое снижение не связано с вирусной инфекцией, а объясняется влиянием вещества непосредственно на процессы клеточного апоптоза. Смесь соединений ПВ-1 и ПВ-2 (вещество ПВ-10) вызывает пролонгированное ингибирование экспрессии белка Bcl-2 в вирусинфицированных клетках, что свидетельствует о вовлечении механизмов индукции апоптоза, связанных с репродукцией вируса. Таким образом, данные соединения являются эффективными при развитии острой литической инфекции и могут предупреждать переход инфекции в латентное состояние за счет индукции процессов апоптоза.

A. V. Golovan, S. D. Zagorodnya, N. V. Nesterova

Study of apoptosis-stimulating effect of isonicotinic acid derivatives in models of acute and latent EBV infections

The search for inducers of apoptosis, which would affect one or several stages of the apoptotic process, is the modern strategy of the therapy of viral diseases and especially of virus-induced tumor growth. The ability of isonicotinic acid derivatives to stimulate apoptosis in Raji lymphoblastoid cells infected with Epstein-Barr virus (EBV) is studied. It is shown that iodine-containing compound PV-1 inhibited expression of Bcl-2 protein after 48 hours in EBV infected cells, i. e., under condition of lytic infection. Compound PV-2 induced a slight decrease in expression of Bcl-2 protein at early point, but this decrease is caused by the direct action of the compound on the processes of cell apoptosis, rather than by viral infection. A mixture of compounds PV-1 and PV-2 (compound PV-10) caused a prolonged inhibition of Bcl-2 protein expression in infected cells, suggesting the involvement of mechanisms of apoptosis associated with virus reproduction. Thus, these compounds were effective under an acute lytic infection development and could prevent the switch to latent infection by inducing apoptosis processes.