

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА НА ФИБРОБЛАСТЫ ЧЕЛОВЕКА, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ

© Н. Е. Федорова,¹ С. С. Емельянова,² Г. Р. Виноградская,^{2, 3, *} Е. В. Чичев,¹
А. В. Мурзакова,¹ А. А. Кириченко,¹ В. Н. Вербенко,² А. А. Куц¹

¹ Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Министерства здравоохранения РФ, Москва;

² Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова,
НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург,

³ Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного политехнического университета;
* электронный адрес: gvinogradskaya@mail.ru

Противораковый антибиотик доксорубин (ДОКС) характеризуется высокой токсичностью, вызывая осложнения в работе жизненно важных органов. Данных о действии ДОКС на нормальные клетки организма недостаточно. Предполагают, что ДОКС индуцирует гибель раковых клеток путем апоптоза, однако сведения о роли белка p73, члена семейства опухолевого супрессора p53, практически отсутствуют. Известно, что цитомегаловирус (ЦМВ) индуцирует антиапоптозную программу, позволяющую вирусу осуществить репликацию своего генома до гибели клетки-мишени. Цель настоящей работы состояла в изучении действия ДОКС на нормальные клетки, анализе способности антиапоптозной программы, запускаемой ЦМВ, оказывать влияние на токсичность ДОКС и в оценке участия белка p73 и его изоформ в регуляции гибели инфицированных клеток под действием ДОКС. Подсчет клеток в цитологических препаратах показал, что в течение 24 ч ДОКС вызывает гибель около 70 % фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) в культуре *in vitro*, а при сочетанном действии ДОКС и ЦМВ гибель клеток уменьшается. Методом TUNEL определено, что количество клеток с разрывами ДНК при действии ДОКС снижается с 5.2 до 3.2 % ($P < 0.05$) при воздействии на ЦМВ-инфицированные клетки. Анализ митотических фигур выявил накопление клеток в митозе под действием ДОКС, тогда как в инфицированных ЦМВ клетках подобного явления не наблюдали. Анализ мРНК двух изоформ белка p73 (TAp73 и dNr73) показал, что в неинфицированных клетках экспрессия изоформы TAp73 очень низкая, тогда как в ЦМВ-инфицированных ФЛЭЧ уровень транскрипции изоформы TAp73 значительно повышен, и впервые обнаружена экспрессия изоформы dNr73. В инфицированных клетках, обработанных ДОКС, не происходило блока митоза, но наблюдалась активация каспаз 8, 9 и 3, которая сопровождалась гибелью клеток, однако не столь массовой, как при действии ДОКС. Полученные данные позволяют заключить, что ЦМВ ослабляет повреждающее действие ДОКС на нормальные клетки. Можно предположить, что индукция TAp73 и появление укороченной изоформы p73 создают условия для аттенуации влияния ДОКС на повреждение ДНК и гибель нормальных клеток.

Ключевые слова: доксорубин, фибробласты человека, цитомегаловирус, изоформы TAp73 и dNr73 белка p73.

Принятые сокращения: ДОКС — доксорубин, ЦМВ — цитомегаловирус, ФЛЭЧ — фибробласты легкого эмбриона человека.

ДОКС — противораковый антибиотик, более 40 лет применяемый для лечения широкого спектра онкологических заболеваний. Его существенным недостатком является значительная токсичность, которая приводит к осложнениям в работе сердца и печени, к потере слуха и другим патологиям. В настоящее время ведутся интенсивные исследования, направленные на поиск средств, снижающих токсичность антибиотика и повышающих чувствительность к нему (Wang et al., 2014; Yu et al., 2014), которые пока не привели к значительным успехам. Одна из причин состоит в недостаточной изученности действия ДОКС на неопухолевые клетки в тканях, окружающих опухоль, в сердце, печени и организме в целом.

Изучение механизмов противоопухолевого действия антибиотика привело к заключению о том, что ДОКС индуцирует гибель клеток путем апоптоза с участием белка p53, однако имеющиеся данные противоречивы, а о роли других белков этого семейства в ДОКС-индуцированном апоптозе сведения немногочисленны (Minotti et al., 2004). В то же время показано, что белок p73 — член семейства противоопухолевых белков p53 — участвует в регуляции клеточного деления и гибели клеток, имеет несколько изоформ, которые могут оказывать как проапоптозное, так и онкогенное действие. Известно, что ЦМВ человека, попадая в клетку, индуцирует антиапоптозную программу, позволяющую вирусу осуществить репликацию свое-

го генома до гибели клетки-мишени. Представляло интерес выяснить, способна ли антиапоптозная программа, запускаемая ЦМВ, оказывать влияние на токсичность ДОКС в отношении нормальных клеток — фибробластов человека, а также каково участие белка p73 и его изоформ в регуляции клеточной гибели под действием ДОКС в инфицированных клетках. Ответы на поставленные вопросы дополняют имеющиеся сведения о механизмах действия и токсичности ДОКС, а также помогут в разработке новых стратегий лечения онкозаболеваний.

Материал и методика

Клетки. Объектом исследования служили диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ), полученные из коллекции клеточных линий Научно-исследовательского института вирусологии им. Д. И. Иванова Министерства здравоохранения РФ (Москва). Культуру клеток выращивали на среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия).

Вирус. Использовали референс-штамм ЦМВ AD 169, любезно предоставленный д-ром Д. Эмануэль (D. Emanuel, США). Вирус размножали путем пассирования на культуре клеток ФЛЭЧ. Фибробласты заражали с инфекционной множественностью 3—5 БОЕ/кл. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37 °С, затем вирусосодержащую жидкость отмывали и вносили подерживающую среду — ДМЕМ с 2 % ЭТС.

Обработка ФЛЭЧ антибиотиком. Клетки высаживали в культуральные флаконы (Coster, США) или в 24-луночные панели (Corning, США) в концентрации 200 тыс. клеток на 1 мл среды и культивировали в течение 48 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. ДОКС C₂₇H₂₉NO₁₁ (Sigma, США) вносили в культуру ФЛЭЧ в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 8 или 24 ч. Действие ДОКС на ФЛЭЧ оценивали в реакциях, описанных ниже.

Обработка ДОКС ЦМВ-инфицированных клеток. Клетки ФЛЭЧ высаживали в концентрации 200 тыс. клеток в 1 мл среды и культивировали в течение 24 ч, как описано выше. Затем заражали ЦМВ с инфекционной множественностью 3—5 БОЕ/кл. Через 24 ч после заражения в культуру инфицированных клеток добавляли ДОКС в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение следующих 24 ч. После 24-часовой инкубации с ДОКС (через 48 ч после заражения ЦМВ) клетки отмывали и проводили сравнительное изучение культуры ФЛЭЧ с помощью методов, описанных ниже.

Цитотоксическое действие ДОКС оценивали путем подсчета ФЛЭЧ в контрольной (без ДОКС) и опытной (обработанной ДОКС) популяциях. Для этого клетки высаживали в 24-луночные планшеты с прозрачными стеклами и добавляли ДОКС в концентрации 5 мкг/мл. После 24-часовой инкубации клетки промывали 0.1 M фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) (ФСБ), затем фиксировали абсолютным метанолом 20 мин при -20 °С. Фиксированные клетки окрашивали гематоксилином Караччи (БорисМ-Авогадро, Россия) и подсчитывали под микроскопом (AxioCamMRC 5, Zeiss, Германия). Подсчитывали клетки не менее чем в 10 полях зрения и результаты выражали в количестве клеток на поле зрения микроскопа (ок. 10×, об. 40×). Долю клеток в опытной культуре выражали в процентах от контрольной популяции.

Обнаружение маркеров апоптоза и аутофагии. В качестве маркеров апоптоза выявляли активированные каспазы 3, 8 и 9, в качестве маркера аутофагии — белок LC3A/B. Проводили иммуноцитохимический анализ в реакции непрямой иммунофлуоресценции *in situ* с использованием специфических антител. Клетки фиксировали охлажденным метанолом, как указано выше, после промывки фиксированных препаратов ФСБ на клетки наносили раствор специфических антител в ФСБ, содержащий 1 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Для выявления каспаз использовали антитела к каспазе 3 (ab52293, Abcam, Великобритания) и каспазе 8 (ab4052, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50 и антитела к каспазе 9 (ab32539, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 100. Для выявления маркера аутофагии использовали антитела к белку LC3A/B (ab58610, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50. После инкубации с первыми антителами клетки промывали и инкубировали со вторыми антителами в течение 30 мин при 37 °С. В качестве вторых антител использовали козы антикроличьи поликлональные антитела, конъюгированные с флуорохромом ФИТЦ (ab98502, Abcam, Великобритания), в разведении 1 : 100. Ядра клеток окрашивали ДНК-тропным красителем DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Препараты с клетками заключали в мовиол (Calbiochem, США) и просматривали в флуоресцентном микроскопе (AxioCamMRC 5, Zeiss, Германия, ок. 10×, об. 100×).

Выявление фрагментированной ДНК. Для обнаружения разрывов в ДНК использовали метод TUNEL. Клетки фиксировали и окрашивали с помощью набора реагентов Dead End™ Colorimetric TUNEL System (Promega, США). Реакцию проводили согласно протоколу фирмы-производителя.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (TaqMan). Общую РНК (примерно из 2 млн клеток) выделяли с помощью набора Aurum Total RNA Minikit (BioRad, США) с добавлением ДНКазы I (BioRad, США) для деградации геномной ДНК. Для обратной транскрипции использовали праймеры, представляющие собой смесь олиго-dT и случайных гексамеров, и другие реагенты из набора iScriptcDNA Synthesis Kit (BioRad, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для проведения ПЦР использовали праймеры и зонды, разработанные нами ранее (Волницкий и др., 2012).

Реакционная смесь (50 мкл) содержала однократный буфер для Taq-полимеразы (pH 8.6), 1 mM хлорид Mg, 2.5 ед. Taq-полимеразы (Силекс, Россия), 250 мкM каждого dNTP, 300 нM прямого и обратного праймеров, 250 нM флуоресцентно меченного зонда (Синтол, Россия) и 2 мкл кДНК. Реакцию проводили на детектирующем амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Денатурацию двухнитевой ДНК на каждом из 45 циклов осуществляли при 95 °С в течение 15 с, а отжиг праймеров и детектирование — при 60 °С в течение 1 мин. Определение пороговых циклов проводили с помощью встроенной в прибор программы CFXManager. Расчет относительных уровней производили с помощью формулы $R = 2^{C_{qref} - C_q}$, где C_q и C_{qref} — пороговые циклы для искомой и референсной кДНК гена *GAPDH*. Результаты представлены в виде соотношения уровней изоформ-специфических мРНК гена *TP73* и нормировочного гена *GAPDH*.

Статистическая обработка результатов. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз с трех-

кратными повторами. Подсчет средних значений и стандартных ошибок проводили с использованием пакета STATISTICA 6.0. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Использованные реактивы. Среда ДМЕМ с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), L-глутамином и гентамицином (ПанЭко, Россия); ДОКС $C_{27}H_{29}NO_{11}$ (Sigma, США); гематоксилин Караччи (БорисМ-Авогадро, Россия); специфические антитела ab52293, ab4052, ab32539 и ab58610 (Abcam, Великобритания); козы антикроличьи поликлональные вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом ФИТЦ, — ab98502; DAPI (Sigma, США); мовиол (Calbiochem, США); набор реагентов DeadEnd™Colorimetric TUNEL-System (Promega, США); набор AurumTotalRNAMinikit с ДНКазой I (BioRad, США); набор iScriptcDNASynthesis-Kit (BioRad, США); буфер для Taq-полимеразы, хлорид магния, Taq-полимераза и dNTP (Силекс, Россия); праймеры и флуоресцентно меченные зонды (Синтол, Россия).

Результаты

Цитотоксическое действие ДОКС на фибробласты человека. Подсчет клеток ФЛЭЧ на цитологических препаратах показал, что через 24 ч культивирования число клеток в контрольной (неинфицированной и не обработанной ДОКС) культуре составляло 112 ± 11 на поле зрения микроскопа. В момент внесения ДОКС в культуру (через 48 ч после начала культивирования) число клеток увеличилось и составило 164 ± 18 на поле зрения. За следующие 24 ч (72 ч после посадки) в контрольной (не обработанной ДОКС) культуре число клеток увеличилось и достигло 193 ± 16 на поле зрения. В то же время в культуре, обработанной ДОКС в течение 24 ч, отметили резкое снижение числа фибробластов до 48 ± 5 на поле зрения ($P < 0.05$) (рис. 1; 2, а). Это означает, что обработка ФЛЭЧ антибиотиком в течение 24 ч в концентрации 5 мкг/мл вызывает гибель около 70 % клеток, и свидетельствует о высокой токсичности ДОКС в отношении фибробластов человека. Полученные данные сходны с результатами авторов, которые показали цитотоксическое действие ДОКС на дифференцированные фибробласты человека (Кожухарова и др., 2012).

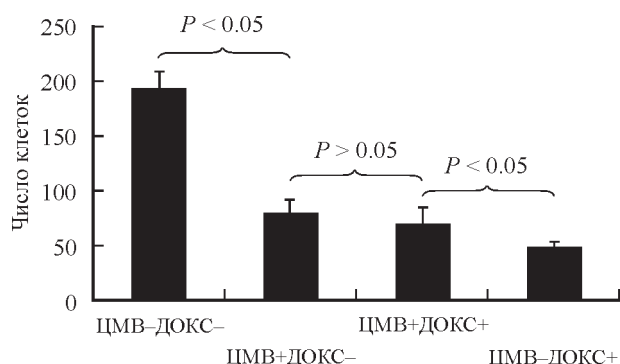


Рис. 1. Влияние ДОКС на гибель клеток в неинфицированной (ЦМВ-) и инфицированной ЦМВ (ЦМВ+) культурах ФЛЭЧ.

Клетки ФЛЭЧ через 24 ч после посева заражали ЦМВ. Через 24 ч после заражения вносили ДОКС и инкубировали последующие 24 ч.

Действие ДОКС на фибробласты человека, инфицированные ЦМВ. Для оценки действия ЦМВ клетки ФЛЭЧ через 24 ч после начала культивирования заражали вирусом и выдерживали в течение следующих 24 и 48 ч (48 и 72 ч после посадки клеток соответственно). Число клеток в препарате снизилось по сравнению с контрольной культурой и составило 99 ± 10 и 79 ± 13 на поле зрения (в контрольной культуре — 164 ± 18 и 193 ± 16 соответственно) (рис. 1). Гибель клеток в ЦМВ-инфицированной культуре составила 40 % через 24 ч инфицирования и 59 % через 48 ч по сравнению с незараженной культурой. При внесении ДОКС в ЦМВ-инфицированную культуру ФЛЭЧ число клеток через 24 ч составило 70 ± 15 на поле зрения, что практически не отличалось от количества клеток в ЦМВ-инфицированной культуре без обработки ДОКС и было в 1.5 раза больше, чем в незараженной культуре ФЛЭЧ, — 48 ± 5 клеток на поле зрения ($P < 0.05$). Таким образом, ФЛЭЧ, инфицированные ЦМВ, продемонстрировали большую устойчивость к цитотоксическому действию ДОКС, чем незараженные клетки. Можно заключить, что развитие ЦМВ-инфекции в фибробластах ослабляет токсическое действие ДОКС на популяцию клеток ФЛЭЧ.

Влияние ДОКС на пролиферацию диплоидных фибробластов человека. Для изучения влияния ДОКС на пролиферацию использовали морфологический критерий — идентификацию клеток, находящихся в митозе, на цитологическом препарате и оценку их количества. Подсчет митотических фигур после окраски ДНК-связывающим красителем DAPI показал, что в момент внесения антибиотика ФЛЭЧ находились в состоянии активного деления — доля клеток в фазе М клеточного цикла составила 15 ± 3 %. Через 24 ч в контрольной (не обработанной антибиотиком) культуре доля митозов уменьшилась почти в 2 раза, составив 8 ± 2 % ($P < 0.05$). Снижение доли митотических клеток можно объяснить тем, что часть клеток прошла все фазы митоза и разделилась, а оставшиеся клетки замедлили митотическое деление и остановились в фазах, предшествующих митозу, в связи с достижением большей плотности моносоля, так как ФЛЭЧ — неопухольевые клетки, обладающие свойством контактного торможения деления. В культуре, обработанной ДОКС, доля митотических фигур сохранялась на высоком уровне (18 ± 2 %). Полученные данные позволяют предположить, что ДОКС блокирует клетки в митозе, и это, по-видимому, является одним из проявлений его цитостатического действия. В ряде работ, выполненных методом проточной цитометрии ДНК, отмечали, что ДОКС блокирует клетки в фазах G_2/M клеточного цикла (Cruet-Hennequart et al., 2012; Fan et al., 2014). Так как метод не позволяет различить фазы клеточного цикла, соответствующие удвоенному содержанию ДНК (4N), авторы высказали предположение о том, что часть обработанных ДОКС клеток может останавливаться не в фазах G_2/M , а переходить в фазу G_1 с удвоенным содержанием ДНК — так называемую фазу $4NG_1$, не пройдя митотического деления (Bielak-Zmijewska et al., 2014).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в условиях наших опытов большая часть клеток ФЛЭЧ под действием ДОКС останавливается в митозе и не переходит в стадию G_1 . Анализ митотических фигур в клетках ФЛЭЧ, инфицированных ЦМВ, показал, что доля клеток, находящихся в митозе, составила 5 ± 1 %. После действия ДОКС на инфицированные клетки этот показа-

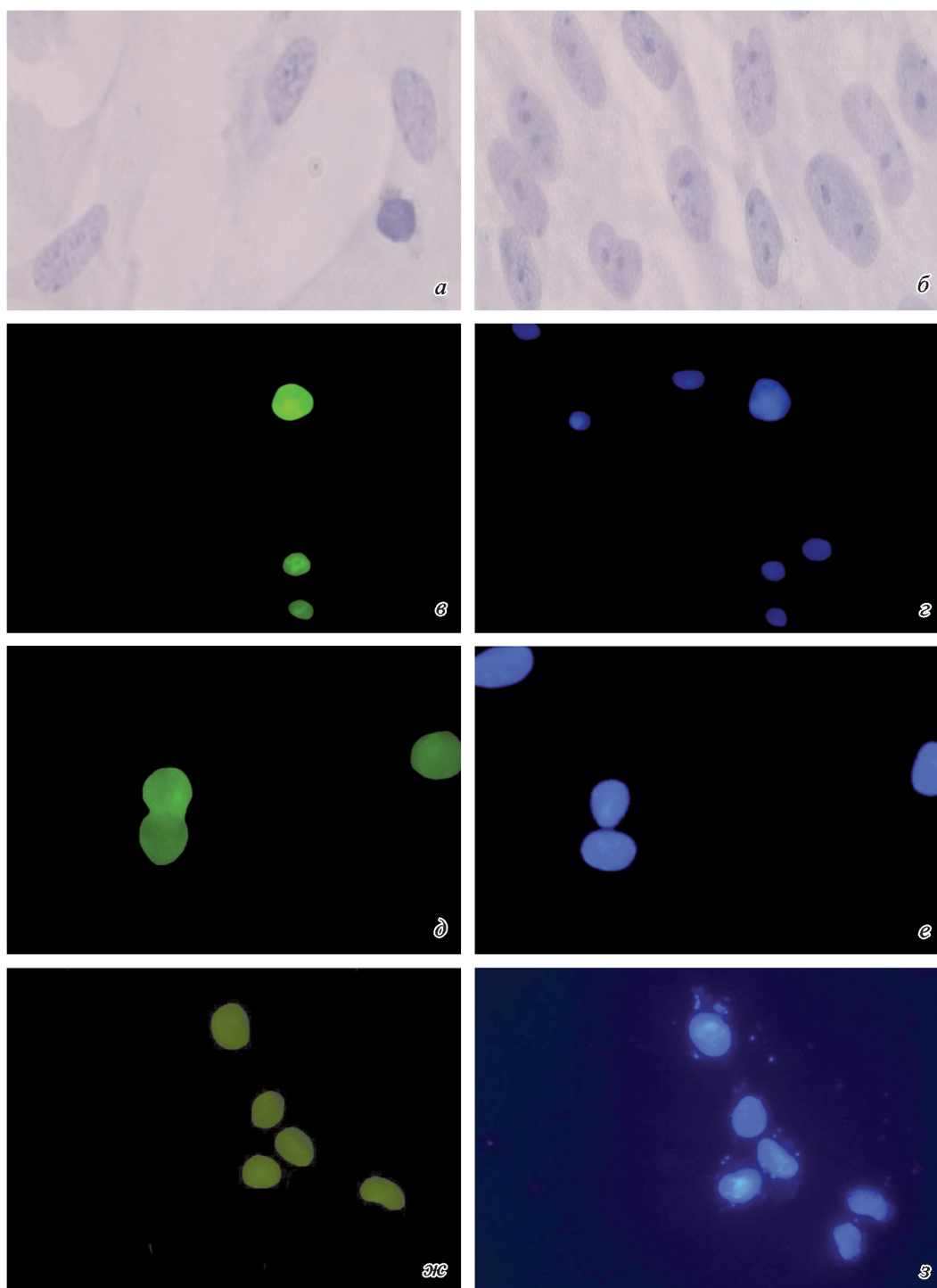


Рис. 2. Действие ДОКС (а, в) и ЦМВ (д, ж) на ФЛЭЧ in vitro.

а — цитотоксическое действие ДОКС на ФЛЭЧ через 24 ч после внесения антибиотика в культуру; б — контроль, окрашивание гематоксилином Караччи; в — визуализация фрагментированной ДНК методом TUNEL в клетках через 24 ч после обработки ДОКС; г, а также е, з — те же клетки, окрашенные DAPI; д — детекция с помощью антител активированной каспазы 3 в клетках через 48 ч после заражения ЦМВ; ж — детекция маркера аутофагии LCP3A/B с помощью антител в клетках через 48 ч после заражения ЦМВ.

тель не изменился — $6 \pm 2\%$. Это значение в 3 раза ниже, чем этот же показатель для популяции неинфицированных ФЛЭЧ, обработанных ДОКС ($18 \pm 2\%$). Полученные данные позволяют заключить, что при воздействии ДОКС на ЦМВ-инфицированные фибробласты предотвращается блок митоза в отличие от популяции незараженных ФЛЭЧ, обработанных этим антибиотиком.

Повреждение ДНК. Одним из механизмов противоопухолевого действия ДОКС является его способность вызывать одиночные и двойные разрывы ДНК (Burden, Osheroff, 1998; Tsang et al., 2003). Представляло интерес выяснить влияние ДОКС на целостность ДНК в ФЛЭЧ. Для этого контрольные (необработанные) и опытные (обработанные ДОКС) клетки изучали с помощью

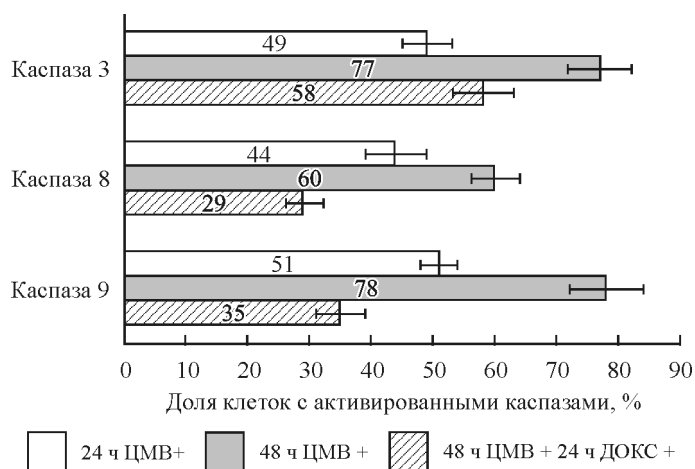


Рис. 3. Определение каспаз 9, 8 и 3 в ЦМВ-инфицированных клетках без обработки ДОКС и через 24 ч после воздействия антибиотика.

метода TUNEL, позволяющего обнаружить разрывы в ДНК. На рис. 2, в представлены результаты окрашивания ФЛЭЧ методом TUNEL. Подсчет TUNEL-положительных клеток (ФЛЭЧ с фрагментированной ДНК) показал, что в контрольной культуре доля клеток с поврежденной ДНК была незначительной — 0.5 ± 0.3 %. После влияния ДОКС доля клеток с фрагментированной ДНК резко возросла, достигнув 5.2 ± 0.8 %, что в 10 раз превышало этот показатель в контрольной культуре ($P < 0.05$). Можно заключить, что одним из механизмов, приводящих к значительному цитотоксическому действию ДОКС на фибробласты, является индукция разрывов в молекуле ДНК. Подобное действие отмечено при воздействии ДОКС и на другие клетки — скелетных мышц (Yu et al., 2014), печени (Wang et al., 2014) и сердца (Lian et al., 2013).

После воздействия антибиотика на клетки ФЛЭЧ, зараженные ЦМВ, доля клеток с выявленными разрывами ДНК увеличилась по сравнению с клетками, не обработанными ДОКС, и составила 3.2 ± 0.7 против 0.8 ± 0.3 % ($P < 0.05$). Однако в неинфицированной популяции доля клеток с поврежденной ДНК после воздействия ДОКС увеличилась более чем в 10 раз, тогда как в инфицированной популяции — в 4 раза. Полученные данные показывают, что в ЦМВ-инфицированных клетках индуцируются механизмы, препятствующие развитию процессов, приводящих к разрывам ДНК при воздействии ДОКС.

Выявление маркеров апоптоза и аутофагии. Методом иммунофлуоресценции *in situ* не удалось выявить в контрольной культуре клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9, которые являются маркерами программируемой гибели клеток. После обработки ДОКС в течение 8 ч в незараженных клетках каспазу 3 выявили в 47 ± 8 % клеток, а каспаз 8 и 9 обнаружено не было. Через 24 ч после обработки ДОКС доля клеток, содержащих активированную каспазу 3, уменьшилась до 7 ± 1 %. В то же время клеток, содержащих каспазы 8 и 9, в популяции обнаружено не было. Отсутствие каспаз 8 и 9, участвующих в инициации апоптоза, можно объяснить недостаточной чувствительностью метода детекции. Не исключено также, что каспаза 8 не активируется в клетках ФЛЭЧ, подобно тому как это отмечено при изучении стромальных клеток (S-type) в нейробластоме (Bian et al., 2004). Выявление активированной формы эффекторной каспазы 3 (executioner) в половине

клеток ФЛЭЧ через 8 ч после обработки антибиотиком указывает на участие каспазозависимых процессов в массовой гибели фибробластов человека к 24 ч после воздействия ДОКС. Снижение доли клеток, содержащих каспазу 3, до 7 %, к этому сроку, возможно, связано с гибелью тех клеток, в которых каспаза 3 активировалась на более ранних сроках (8 ч воздействия ДОКС). Другим объяснением может быть более поздняя активация апоптоза в оставшихся клетках или меньшая чувствительность их к действию антибиотика.

В ЦМВ-инфицированные ФЛЭЧ ДОКС добавляли через 24 ч после заражения. К этому моменту в зараженных клетках выявили каспазы 3, 8 и 9. Доля положительно окрашенных клеток составляла 49 ± 5 , 44 ± 3 и 51 ± 4 % соответственно. В течение следующих 24 ч (48 ч после инфицирования) в зараженной популяции ФЛЭЧ, не обработанных ДОКС, доля положительно окрашенных клеток увеличилась и достигла 77 ± 5 , 60 ± 4 и 78 ± 6 % соответственно (рис. 2, д; 3). После воздействия ДОКС в течение 24 ч в инфицированной популяции (48 ч после заражения) доля клеток, содержащих каспазы 8 и 9, снизилась в 1.5 раза, составив 29 ± 5 и 35 ± 3 % соответственно ($P < 0.05$). Доля клеток, окрашенных антителами к каспазе 3, составила 58 ± 4 % и была значительно меньше, чем в инфицированной популяции без действия ДОКС — 77 ± 5 % ($P < 0.05$) (рис. 3). Можно констатировать, что количество клеток с активированными каспазами в ЦМВ-инфицированной популяции ФЛЭЧ значительно уменьшается при воздействии на эти клетки ДОКС. Полученные данные показывают, что и ЦМВ, и ДОКС индуцируют активацию каспазозависимого апоптоза. В то же время не исключено, что динамика апоптоза при этих воздействиях различается.

В настоящее время показано, что гибель клеток может осуществляться с использованием разных молекулярных и клеточных механизмов, среди которых наряду с апоптозом отмечена аутофагия. В связи с этим представлялось интересным выяснить вклад процессов аутофагии в гибель клеток ФЛЭЧ под действием ДОКС. Определение маркера аутофагии — белка LCP3A/B — методом иммуноцитохимического анализа показало, что как в контрольных клетках, так и в клетках, обработанных ДОКС, данный белок практически не обнаруживался. В инфицированных ЦМВ фибробластах через 24 ч после заражения доля клеток, окрашенных антителами к белку

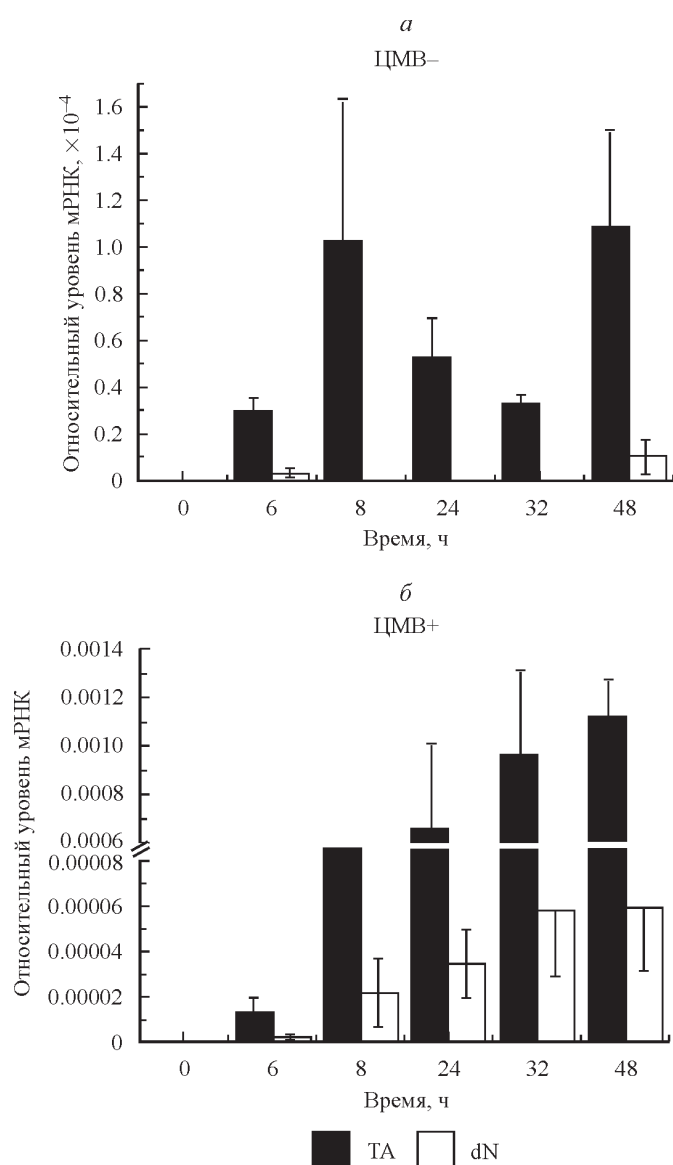


Рис. 4. Изменение экспрессии гена *TP73* в клетках ФЛЭЧ на разных стадиях ЦМВ-инфекции.

По горизонтали — время культивирования, ч; по вертикали — отношение уровней изоформ-специфических мРНК гена *TP73* и референсного гена *GAPDH*. *a* — контрольные клетки, отсчет времени начинали через 24 ч после начала культивирования; *б* — клетки на разных стадиях после заражения ЦМВ.

ЛСР3А/В, находилась на уровне контрольной популяции и не превышала 0.2 ± 0.1 %. Однако через 48 ч после инфицирования маркер аутофагии выявили уже в 83 ± 6 % инфицированных клеток (рис. 2, *ж*). Действие ДОКС на инфицированные ФЛЭЧ не изменило долю ЛСР3А/В-положительных клеток. Таким образом, можно предположить, что в гибели ФЛЭЧ (не инфицированных ЦМВ) под воздействием ДОКС в условиях наших опытов участвуют процессы апоптоза и не вовлечены механизмы аутофагии с участием белка ЛСР3А/В. Результаты опубликованных работ об участии аутофагии в ответе на ДОКС противоречивы. Наши данные согласуются с результатами авторов, не обнаруживших изменений в экспрессии пяти изученных ими маркеров аутофагии в скелетных

мышцах мышей под воздействием ДОКС (Yu et al., 2014). Другие авторы наблюдали увеличение уровня экспрессии белков, индуцируемых при аутофагии: при воздействии ДОКС на клетки остеосаркомы U2OSandSaos-2 (Zhao et al., 2014), гепатомы Hep3В (Chen et al., 2014) и на культивируемые клетки рака яичника (Fong et al., 2012). Расхождения данных могут быть объяснены разными путями ответа клеток на действие ДОКС *in vitro* и *in vivo*, разными клеточными моделями и даже разными видами подопытных животных (Dirks-Naylor, 2013). Что касается влияния ДОКС на ЦМВ-инфицированные ФЛЭЧ, то можно предположить, что в условиях наших опытов антибиотик не оказывает влияния на аутофагию ФЛЭЧ, отмеченную в большинстве зараженных клеток на поздних стадиях инфекции.

Изменение уровня мРНК для изоформ белка *p73* в инфицированных ФЛЭЧ. Исследование транскрипции гена *TP73* методом ОТ-ПЦР показало присутствие в неинфицированной культуре ФЛЭЧ мРНК для полноразмерной изоформы белка ТАР73. Однако уровни транскрипции были низкими (10^{-4} — 10^{-5} от уровня транскрипции референсного гена) и колебания в динамике культивирования в течение 48 ч были статистически незначимы (рис. 4, *a*). Укороченная изоформа *dNp73* вообще не определялась.

В ЦМВ-инфицированной культуре ФЛЭЧ уже через 8 ч после заражения уровень транскрипции полноразмерной изоформы ТАР73 существенно повышался (рис. 4, *б*). К 24 ч после заражения уровень ТАР73 превышал уровень в контроле в 15—20 раз. Высокий уровень мРНК для ТАР73 наблюдался и на следующих сроках вплоть до 48 ч после инфицирования. Необходимо отметить появление изоформы *dNp73* в инфицированных ФЛЭЧ, несмотря на то что уровень мРНК для этой изоформы (транскрибируемой со второго промотора, расположенного в альтернативном третьем интроне) относительно небольшой. Активация транскрипции гена *TP73* и появление изоформы *dNp73* в ЦМВ инфицированных нормальных (неопухолевых) ФЛЭЧ, насколько нам известно, показаны нами впервые.

Обсуждение

Совокупность полученных данных, обобщенных в таблице, показывает, что при сочетанном действии ДОКС и ЦМВ уменьшается гибель клеток ФЛЭЧ, снижается количество клеток с поврежденной ДНК и не наблюдается блока митоза по сравнению с незараженными клетками, обработанными ДОКС. Можно предположить, что ЦМВ аттенуирует повреждающее действие ДОКС на нормальные клетки. ДОКС оказывает противоопухолевое действие, повреждая ДНК раковой клетки. В то же время генотоксический эффект ДОКС оказывает также на другие клетки организма, в том числе сердца, в ткани которого изменяется экспрессия 11 генов, участвующих в повреждении ДНК и репарации (Manjanatha et al., 2014). Снятие повреждающего действия ДОКС на нормальные клетки организма — важная задача, решение которой зависит от нахождения факторов, которые позволили бы предотвратить гибель нормальных клеток, сохранив противоопухолевую активность антибиотика. Направление поиска таких факторов может быть найдено при изучении ЦМВ-инфекции и противовирусного ответа клетки.

Влияние ДОКС на ФЛЭЧ, инфицированные и неинфицированные ЦМВ

Клетки ^а	Число клеток в поле зрения	Число митозов, %	Доля TUNEL-положительных клеток, %	Доля клеток (%), содержащих			
				каспазу 3	каспазу 8	каспазу 9	LC3A/B
ЦМВ – ДОКС –	193 ± 16	8 ± 2	0.5 ± 0.3	0	0	0	0.2 ± 0.1
ЦМВ + ДОКС –	79 ± 13 ^б	5 ± 1	0.8 ± 0.3	77 ± 5 ^б	60 ± 4 ^б	78 ± 6 ^б	83 ± 6 ^б
ЦМВ – ДОКС +	48 ± 5 ^б	18 ± 2 ^б	5.2 ± 0.8 ^б	7 ± 1 ^б	0	0	0
ЦМВ + ДОКС +	70 ± 15 ^б	6 ± 2	3.2 ± 0.7 ^б	58 ± 4 ^б	29 ± 5 ^б	35 ± 3 ^б	79 ± 8 ^б

^а Клетки ФЛЭЧ через 24 ч после посадки заражали ЦМВ. Через 24 после заражения вносили ДОКС и инкубировали следующие 24 ч. Контрольные клетки (ЦМВ–ДОКС–) анализировали в конце опыта (через 72 ч после посадки). ^б Значения, отличающиеся от контрольных (ЦМВ–ДОКС–) в каждом столбце ($P < 0.05$, критерий Стьюдента).

Известно, что на ранних стадиях инфекции ЦМВ способен препятствовать развитию апоптоза, сохраняя жизнеспособность клеток до окончания репликативного цикла своего генома. Показано, что ряд генов ЦМВ участвует в противодействии апоптозу, в том числе *UL36* (*vICA*), который подавляет активацию прокаспазы 8; *UL37* (*vMIA*) — митохондриальный ингибитор апоптоза, который взаимодействует с белком Вах и предотвращает пермеабиллизацию митохондриальной мембраны (Goldmacher, 2005). В клетках, зараженных ЦМВ, на ранних стадиях не происходит разрывов ДНК, выявляемых методом TUNEL (Chiou et al., 2001; Федорова и др., 2008), а также обнаружены белки, сохраняющие целостность клеточной ДНК при ЦМВ-инфекции (Fortunato, Spector, 1998). Опубликованы данные о том, что под действием ЦМВ повышается устойчивость клеток к различным факторам, индуцирующим апоптоз, в том числе к цитотоксическим веществам, таким как актиномицин Д и цисплатин (Cinatl et al., 1998; Terrasson et al., 2005).

В последнее время внимание исследователей привлекает белок p73, ген которого имеет значительное сходство с последовательностями прототипного опухолевого супрессора — белка p53. Отличительной особенностью белка p73 является образование большого количества С- и N-концевых изоформ как результат использования альтернативного сплайсинга и альтернативного промотора. О роли изоформ белка p73 сведений недостаточно, но данные об антагонистических функциях некоторых изоформ позволили исследователям поставить вопрос: чем же является p73 — опухолевым супрессором или онкогеном (Stiewe, Pützer, 2002)? Мало известно и об участии изоформ p73 в регуляции пролиферации и гибели нормальных клеток, в том числе под действием ДОКС.

Мы измерили уровни мРНК двух изоформ белка p73 — TAp73 и dNp73 — в ФЛЭЧ и проанализировали эффективность проявления маркеров программированной гибели клеток — активированных каспаз. Полученные данные показали, что уровень транскрипции изоформы TAp73 в неинфицированных ФЛЭЧ хотя и низок, но достаточен для индукции апоптоза под действием ДОКС. Известно, что в ответ на повреждение ДНК транскрибирующая функция белка p73 повышается в основном не через активацию транскрипции его гена, а на белковом уровне с помощью многочисленных посттрансляцион-

ных модификаций. Кроме того, показано, что изоформа TAp73 необходима для контактного торможения роста клеток (Beitzinger et al., 2008). Роль белка TAp73 в предотвращении контактно-независимой пролиферации связана с его транскрипционной программой (отличной от p53), а именно с находящимися под его контролем мембранными белками FAM38B и KCNK1. Отмеченное незначительное повышение уровня мРНК для изоформы TAp73 к 48 ч может быть связано с уже начавшимся торможением клеточной пролиферации (72 ч после начала культивирования).

Сравнительный анализ уровней мРНК изоформ белка p73 показал, что в ФЛЭЧ, инфицированных ЦМВ, значительно повышается транскрипция гена *TP73*, причем с обоих промоторов. Не исключено, что увеличение уровня мРНК для изоформы TAp73 в этой ситуации является проявлением регуляторного механизма, предотвращающего появление абберантных митозов и нестабильности генома (Talos et al., 2007). Возможно, с этим связано отсутствие накопления клеток в митозе, наблюдавшееся нами при действии ДОКС на ЦМВ-инфицированные ФЛЭЧ. Появление укороченной изоформы dNp73 представляет особый интерес, так как эта изоформа, взаимодействуя с TAp73, ингибирует ее транскрипционную активность, что в свою очередь ингибирует индуцированный апоптоз. Второй механизм, с помощью которого эта укороченная изоформа белка p73 может увеличивать устойчивость клеток к ДОКС, может быть связан с недавно открытой новой функцией белка dNp73 (Wilhelm et al., 2010). Показано, что dNp73 локализуется непосредственно на сайте повреждения ДНК, взаимодействует с сенсорным белком 53BP1 и ингибирует активацию АТМ и последующее фосфорилирование p53, таким образом влияя и на p53-зависимый апоптоз. Наблюдаемая нами активация каспаз в большинстве ЦМВ-инфицированных клеток сопровождалась гибелью клеток, однако не столь массовой, как при действии ДОКС (см. таблицу). Можно предположить, что в механизм гибели ФЛЭЧ включается индукция экспрессии изоформы dNp73. Появление укороченной изоформы создает условия для аттенуации влияния ДОКС на повреждение ДНК и гибель клеток. Изученная клеточная система открывает перспективу поиска факторов, снижающих токсическое действие ДОКС на нормальные клетки организма.

Список литературы

- Волницкий А. В., Виноградская Г. Р., Филатов М. В. 2012. Экспрессия гена *p73* в глиомах. Вопросы онкологии. 58 (4) : 545—548. (Volnitsky A. V., Vinogradskaya G. R., Filatov M. V. 2012. Expression of gene *p73* in glioms. Problems in Oncology. 58 (4) : 545—548.)
- Кожухарова И. В., Гринчук Т. М., Пуговкина Н. А., Ковалева З. В., Алексеенко Л. П., Никольский Н. Н. 2012. Сравнительная оценка чувствительности эмбриональных стволовых клеток человека к цитотоксическому действию доксорубина. Цитология 54 (10) : 761—766. (Kozhukharova I. V., Grinchuk T. M., Pugovkina N. A., Kovaleva Z. V., Alekseenko L. P., Nikol'skii N. N. 2012. Examination of cytotoxic effect of anti-cancer drug doxorubicin on human embryonic stem cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 54 (10) : 761—766.)
- Федорова Н. Е., Соколова Т. М., Меджидова М. Г., Урываев Л. В., Куц А. А. 2008. ЦМВ-индуцированная гибель клеток и экспрессия гена *fas* в покоящихся и пролиферирующих фибробластах человека. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 5 : 42—48. (Fedorova N. E., Sokolova T. M., Medzhidova M. G., Uryaev L. V., Kushch A. A. 2008. CMV-induced cell death and *fas* gene expression in resting and proliferating human fibroblasts. Zh. Mikrobiol. epidemiol. immunobiol. 5 : 42—48.)
- Beitzinger M., Hofmann L., Oswald C., Beinoraviciute-Kellner R., Sauer M., Griesmann H., Bretz A. C., Burek C., Rosenwald A., Stiewe T. 2008. *p73* poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. EMBO J. 27 : 792—803.
- Bian X., Giordano T. D., Lin H. J., Solomon G., Castle V. P., Opirari A. W. 2004. Chemotherapy-induced apoptosis of S-type neuroblastoma cells requires caspase-9 and is augmented by CD95/Fas stimulation. J. Biol. Chem. 279 (6) : 4663—4669.
- Bielak-Zmijewska A., Wnuk M., Przybylska D., Grabowska W., Lewinska A., Alster O., Korwek Z., Cmoch A., Myska A., Pikula S., Mosieniak G., Sikora E. 2014. A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. Biogerontology. 15 (1) : 47—64.
- Burden D. A., Osheroff N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. Biochim. biophys. acta. 1400 (1-3) : 139—154.
- Chen L., Ye H. L., Zhang G., Yao W. M., Chen X. Z., Zhang F. C., Liang G. 2014. Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells. PLoS ONE. 9 (1) : e85771.
- Chiou S. H., Liu J. H., Hsu W. M., Chen S. S., Chang S. Y., Juan L. J., Lin J. C., Yang Y. T., Wong W. W., Liu C. Y., Lin Y. S., Liu W. T., Wu C. W. 2001. Up-regulation of Fas ligand expression by human cytomegalovirus immediate-early gene product 2: a novel mechanism in cytomegalovirus-induced apoptosis in human retina. J. Immunol. 167 : 4098—4103.
- Cinatl J., Jr., Cinatl J., Vogel J. U., Katchetkov R., Driever P. H., Kabickova H., Kornhuber B., Schwabe D., Doerr H. W. 1998. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. Cancer Res. 58 : 367—372.
- Cruet-Hennequart S., Prendergast A. M., Shaw G., Barry F. P., Carty M. P. 2012. Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. Int. J. Hematol. 96 : 649—656.
- Dirks-Naylor A. J. 2013. The role of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Life Sci. 93 : 913—916.
- Fan C., Zheng W., Fu X., Li X., Wong Y. S., Chen T. 2014. Strategy to enhance the therapeutic effect of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma by selenocystine, a synergistic agent that regulates the ROS-mediated signaling. Oncotarget. 5 (9) : 2853—2863.
- Fong M. Y., Jin S., Rane M., Singh R. K., Gupta R., Kakar S. S. 2012. Withaferin synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer. PLoS ONE. 7 (7) : e42265.
- Fortunato E. A., Spector D. H. 1998. *p53* and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. J. Virol. 72 (3) : 2033—2039.
- Goldmacher V. S. 2005. Cell death suppression by cytomegaloviruses. Apoptosis. 10 (2) : 251—265.
- Lian W. S., Chiou H. C., Lin H., Chen J. J., Cheng C. F. 2013. The prostaglandin agonist beraprost aggravates doxorubicin-mediated apoptosis by increasing iNOS expression in cardiomyocytes. Curr. Vasc. Pharmacol. PMID 23628005.
- Manjanatha M. G., Bishop M. E., Pearce M. G., Kulkarni R., Lyn-Cook L. E., Ding W. 2014. Genotoxicity of doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. Environ. Mol. Mutagen. 55 (1) : 24—34.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol. Rev. 56 : 185—229.
- Stiewe T., Putzer B. M. 2002. Role of *p73* in malignancy: tumor suppressor or oncogen? Cell Death Differ. 9 (3) : 237—245.
- Talos F., Nemajerova A., Flores E. R., Petrenko O., Moll U. M. 2007. *p73* suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional *p53*. Mol. Cell. 27 : 647—659.
- Terrasson J., Allart S., Martin H., Lulé J., Haddada H., Caput D., Davrinche C. 2005. *p73*-dependent apoptosis through death receptor: impairment by human cytomegalovirus infection. Cancer Res. 65 (7) : 2787—2794.
- Tsang W. P., Chau S. P., Kong S. K., Fung K. P., Kwok T. T. 2003. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced *p53*-independent apoptosis. Life Sci. 73 (16) : 2047—2058.
- Wang B., Ma Y., Kong X., Ding X., Gu H., Chu T., Ying W. 2014. NAD(+) administration decreases doxorubicin-induced liver damage of mice by enhancing antioxidation capacity and decreasing DNA damage. Chem. Biol. Interact. 212 : 65—71.
- Wilhelm M. T., Rufini A., Wetzel M. K., Tsuchihara K., Inoue S., Tomasini R., Itie-Youten A., Wakeham A., Arsenian-Henriksson M., Melino G., Kaplan D. R., Miller F. D., Mak T. W. 2010. Isoform-specific *p73* knockout mice reveal a novel role for $\Delta Np73$ in the DNA damage response pathway. Genes Develop. 24 : 549—560.
- Yu A. P., Pei X. M., Sin T. K., Yip S. P., Yung B. Y., Chan L. W., Wong C. S., Sui P. M. 2014. Acylated and unacylated dherin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle. Acta Physiol. Oxford. 211 (1) : 201—213.
- Zhao D., Yuan H., Yi F., Meng C., Zhu Q. 2014. Autophagy prevents doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma. Mol. Med. Rep. 9 (5) : 1975—1981.

EFFECT OF ANTI-CANCER DRUG DOXORUBICINE ON CYTOMEGALOVIRUS
INFECTED HUMAN FIBROBLASTS

*N. E. Fedorova,¹ S. S. Emelianova,² G. R. Vinogradskaya,^{2, 3, *} E. V. Chichev,¹ A. V. Murzakova,¹
A. A. Kirichenko,¹ V. N. Verbenko,² A. A. Kushch¹*

¹ D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow,

² B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, NRC «Kurchatov Institute», St. Petersburg,

and ³ St. Petersburg State Polytechnical University;

* e-mail: gvinogradskaya@mail. ru

The anticancer antibiotic doxorubicine (DOX) is highly toxic and induces functional complications in vital organs. The effect of DOX on normal cells has not been examined in sufficient detail, and the search for compounds reducing DOX toxicity did not lead to success so far. It has been suggested that DOX induces death of cancer cells via p53-dependent apoptosis, however, the information regarding the role of p73 protein, a member of p53 tumor suppressor family, is scanty. Cytomegalovirus (CMV) induces an antiapoptosis program that allows its replication until death of the target cell. Our objectives were to examine the effect of DOX on normal cells (human fibroblasts), analyze the ability of CMV-induced antiapoptosis program to reduce DOX toxicity, and to evaluate the involvement of p73 protein and its isoforms in the regulation of death of CMV-infected and DOX-treated cells. Within a 24-h time period DOX caused death of about 70 % human embryonic lung fibroblasts (HELFL) in cell culture, this parameter decreased significantly in CMV-infected DOX-treated HELFL cells. TUNEL has shown that the number of cells with DNA fragmentation decreases from 5.2 % under the effect of DOX to 3.2 % ($P < 0.05$) after combined CMV-DOX treatment. Analysis of mitotic figures revealed that DOX causes accumulation of mitotic cells, which was not observed in CMV-infected DOX-treated cells. PCR analysis of mRNA of two p73 protein isoforms (TAp73 and dNp73) has shown that in uninfected cells the expression of TAp73 isoform was low, while in CMV-infected cells level of TAp73 was significant and expression of dNp73 was demonstrated for the first time. Expression of TAp73 associated with lack of mitosis block. The activation of caspases 8, 9 and 3 in CMV-infected cells was registered but cell death was not, however, as massive as that caused by DOX. From these findings it can be concluded that CMV attenuates DOX-related damage to normal cells. It can be suggested that induction of TAp73 and dNp73 isoforms provides conditions for reduction of DOX effect which leads to DNA damage and death of normal cells.

Key words: doxorubicin, fibroblasts, cytomegalovirus, TAp73, dNp73, p73.