

APOPTOSIS INDUCTION IN HUMAN MALIGNANT LYMPHOID CELLS BY DNA-DAMAGING AGENTS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF ACTION

A.A. *Phylchenkov**, M.P. *Zavelevich*, **Z.A. *Butenko***

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 03022, Ukraine*

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ С РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ

A.A. *Фильченков**, M.P. *Завелевич*, **Z.A. *Бутенко***

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина*

Induction of apoptosis by fludarabine phosphate and etoposide in human malignant lymphoid cell lines Namalwa, Raji, CEM, and MT-4 was analyzed on comparative basis using morphological criteria, flow cytometry and DNA electrophoresis in agarose gel. B cell line Namalwa was shown to be less susceptible to etoposide than to fludarabine. At the same time B cell line Namalwa was more resistant to etoposide than T cell line CEM. Fludarabine induced apoptosis both in B and T (MT-4) cells. While etoposide induced apoptosis in 4 h upon the beginning of incubation (short-term apoptosis), specific apoptotic changes induced by fludarabine were evident only in 72 h (delayed apoptosis). Preincubation of Namalwa or MT-4 cells with non-toxic concentration of zinc sulfate (40 mol/l) makes them more susceptible to apoptosis induction by etoposide and not by fludarabine being suggestive of zinc potentiation of short-term apoptosis in malignant lymphoid cells under study.

Key Words: apoptosis, etoposide, fludarabine phosphate, zinc ion, flow cytometry, electrophoresis of DNA.

С помощью морфологического и цитофлуориметрического методов, электрофоретического разделения ДНК в агарозном геле проанализированы особенности и динамика индукции апоптоза флударабином и этопозидом в злокачественных лимфоидных клетках человека линий Namalwa, Raji, CEM и MT-4. Показано, что В-клеточная линия Namalwa менее чувствительна к действию этопозид, чем флударабина. Этопозид оказывает более выраженное цитотоксическое действие на Т-клеточную линию CEM по сравнению с клетками линии Namalwa. Флударабин индуцирует апоптоз и в Т-клеточной линии MT-4. Динамика развития апоптоза при действии этопозид и флударабина существенно различается. Изменения, характерные для апоптических клеток, наблюдаются уже через 4 ч после добавления этопозид (так называемый краткосрочный апоптоз), тогда как в случае применения флударабина аналогичные изменения в клетках развиваются только через 72 ч (так называемый отсроченный апоптоз). Предварительная обработка клеток Namalwa или MT-4 $ZnSO_4$ в нетоксической концентрации (40 мкмоль/л) повышает их чувствительность к апоптоз-индуцирующему действию этопозид, но не флударабина, что позволяет предположить потенцирующий эффект ионов цинка на развитие краткосрочного апоптоза в исследуемых злокачественных лимфоидных клетках.

Ключевые слова: апоптоз, этопозид, флударабина фосфат, ионы цинка, проточная цитофлуориметрия, электрофорез ДНК.

Апоптоз представляет собой форму гибели клеток, при которой активация специальных внутриклеточных механизмов приводит к их самоустраниению. В отличие от некроза, апоптоз является иммунологически инертным энергозависимым процессом отмирания одиночных клеток. Наиболее характерными для апоптических клеток морфологическими изменениями считают следующие: образование выпячиваний плазматической мембраны и сжатие клетки, агрегация хроматина, фрагментация ядра и конденсация цитоплазмы, а позднее — фрагментация клетки с образованием

апоптических телец (везикул, покрытых плазматической мембраной), содержащих фрагменты ядра (или без них). При этом погибающие клетки и апоптические тельца в значительной степени сохраняют целостность наружной мембраны [2].

Антибластическая активность многих из используемых в онкологической практике терапевтических средств связана с их способностью индуцировать апоптоз опухолевых клеток. Флударабина фосфат (в дальнейшем флударабин) и этопозид широко используют в современных схемах терапии лейкозов и лимфом [1]. Механизмы противоопухолевого действия этих двух препаратов различны. Этопозид ингибирует ДНК-топоизомеразу II путем образования комплексов с ферментом и ДНК, что препятствует воссоединению разрывов ДНК, образующихся в процессе ее репликации.

Received: June 20, 2000.

*Correspondence. Fax: (380-44) 267-1656

E-mail: butenko@onconet.kiev.ua

Используемые сокращения: АИ — апоптический индекс; ВЭБ — вирус Эпштейна-Барр.

Флударабин является метаболическим ингибитором ферментов синтеза ДНК, таких, как рибонуклеотидредуктаза, ДНК-полимераза, ДНК-праймаза и ДНК-лигаза. Препарат высокоактивен при лечении вялотекущих В-клеточных лимфом. Однако, в отличие от этопозида, характер и особенности гибели злокачественных лимфоидных клеток, индуцированной флударабином, изучены очень мало. Целью настоящего исследования было сравнение особенностей и динамики развития апоптических изменений, вызываемых флударабином и этопозидом в перевиваемых линиях клеток лейкозов и лимфом человека, а также изучение влияния ионов цинка на чувствительность клеток к индукции апоптоза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили *in vitro* на перевиваемых линиях злокачественных лимфоидных клеток человека. Использовали В-клеточные линии Namalwa и Raji, полученные из лимфомы Беркитта, и Т-клеточные линии МТ-4 и СЕМ. Клетки культивировали в суспензии при температуре 37°C в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота и 2 ммоль/л L-глутамин, по стандартной методике. Пассажи культур клеток, достигших стационарной фазы роста, проводили путем добавления к ним свежей среды в соотношении, рекомендованном для каждой из исследуемых линий.

В работе применяли флударабина фосфат производства фирмы Schering AG (США) и этопозид — фирмы Bristol-Myers Squibb SpA (Италия) в концентрациях 1,5–350 мкмоль/л и 4–250 мкмоль/л соответственно. Цитотоксическое действие препаратов оценивали путем расчета индекса выживания клеток. Для этого в камере Горяева подсчитывали концентрацию погибших клеток в препаратах, окрашенных трипановым синим. Морфологические исследования клеток проводили в цитологических препаратах, окрашенных по Май-Грюнвальд — Гимзе.

Для выявления апоптических клеток с помощью проточной цитофлуориметрии их фиксировали в 70% этаноле, а затем на протяжении ночи инкубировали в гипотоническом растворе пропидия йодида (50 мкг/мл), содержащем 0,1% натрия цитрата и 0,1% тритона X-100. Флуоресценцию клеток оценивали, используя проточный цитофлуориметр FACScan фирмы Becton Dickinson (США). АИ рассчитывали по формуле:

$$АИ = \frac{\text{количество апоптических клеток}}{\text{общее количество клеток}} \times 100\%.$$

Для анализа фрагментации ДНК из клеток выделяли ДНК по методу М. Неггманн и соавторов [3] в нашей модификации. Отмытые клетки лизировали буфером, содержащим 1% NP-40, 20 ммоль/л EDTA, 50 ммоль/л Tris-HCl (pH 7,5). Надосадочную жидкость последовательно обрабатывали SDS (1%), РНКазой А (5 мкг/мкл, 2 ч при температуре

56°C) и протеиназой К (2,5 мкг/мкл, 12 ч при температуре 56°C). ДНК осаждали на холоду этанолом в присутствии аммония ацетата. Полученные осадки перерастворяли и анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,01% этидия бромид.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены дозозависимые кривые цитотоксического действия исследуемых препаратов, полученные при культивировании клеток Namalwa с различными концентрациями флударабина и этопозида на протяжении соответственно 72 и 18 ч. Как видно, в случае флударабина выход кривой на плато происходит в диапазоне гораздо более низких концентраций препарата. Индекс выживания клеток, инкубированных с флударабином в концентрации 175 мкмоль/л на протяжении 72 ч, был примерно одинаковым для В- и Т-клеточных культур и в среднем составил 25%. В то же время были отмечены существенные различия в чувствительности В- и Т-клеток к этопозиду. Индекс выживания клеток, инкубированных с этопозидом при концентрации 250 мкмоль/л на протяжении 18 ч, составил около 10% для клеток линии СЕМ и 60% — для клеток линии Namalwa. Подобные результаты были получены при сопоставлении параметров цитотоксичности этопозида по отношению к клеткам МТ-4 и Raji. Таким образом, В-клетки значительно менее чувствительны к цитотоксическому действию этопозида по сравнению с Т-клетками.

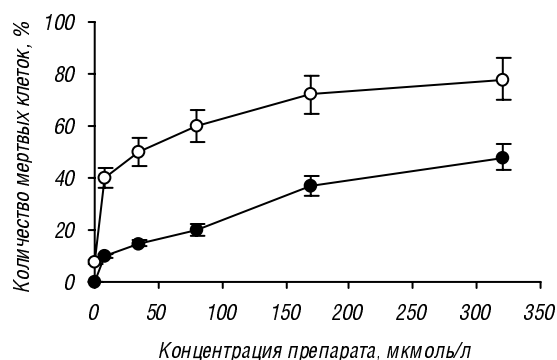


Рис. 1. Дозозависимость цитотоксического действия флударабина —○— и этопозида —●— на клетки Namalwa

После инкубации с флударабином в концентрации 7–35 мкмоль/л В-клеточной (Namalwa) и Т-клеточной (МТ-4) линий отмечено появление морфологических изменений, типичных для апоптоза. Такие изменения выражались во фрагментации ядер с последующим их пикнозом, появлении характерных протрузий плазматической мембраны, конденсации клеток в целом (рис. 2). При использовании препарата в дозах 175 мкмоль/л и выше количество клеток с типичными признаками апоптоза уменьшалось при одновременном увеличении доли клеток с признаками некротизации. Для пос-

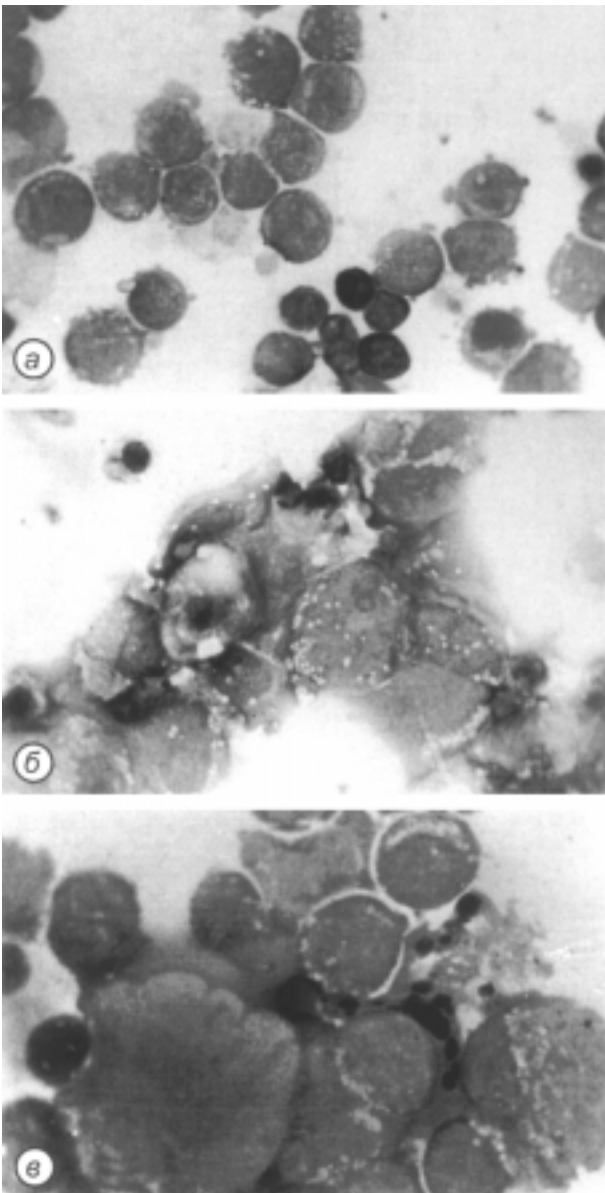


Рис. 2. Клетки линии Namalwa: а – контроль; б – после обработки флударабином (7 мкмоль/л, 72 ч); в – после обработки этопозидом (20 мкмоль/л, 4 ч). Окраска по Май-Грюнвальд — Гимзе, х 90

ледних были характерны выраженная вакуолизация цитоплазмы и ядра, а также появление грубо-сетчатой структуры хроматина. В препаратах наблюдали также митотические фигуры, а в ряде случаев — аномальные митозы.

Интересно отметить, что инкубация клеток с флударабином в концентрации 7–35 мкмоль/л в течение 24 ч с последующим отмыванием их и инкубированием в среде, не содержащей этот препарат, приводила к гибели клеток в последующие 48 ч. Динамика развития апоптоза, индуцированного флударабином или этопозидом, существенно различалась. Так, флударабин вызывал гибель клеток линий Namalwa и МТ–4 только через 72 ч культивирования, тогда как апоптоз–индуцирующее действие этопозидом проявлялось уже через 4–18 ч.

Морфологические изменения, вызываемые этопозидом в клетках линий Namalwa, Raji, СЕМ и МТ–4, были подобны таковым в клетках, обрабо-

танных флударабином (см. рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что в клетках линии СЕМ более четко выражены поздние стадии апоптоза: в цитологических препаратах видны апоптические тельца, содержащие фрагменты ядра. При изучении линии Namalwa эти стадии гибели клеток встречались крайне редко. При этом как в В–, так и Т–клеточных линиях выявляли клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза. Оптимальной для индукции апоптоза оказалась доза этопозидом от 20 до 100 мкмоль/л. Как и в случае флударабина, при действии более высоких концентраций этопозидом (150 мкмоль/л и выше) при одновременном увеличении числа некротически измененных клеток уменьшалось количество клеток с типичными признаками апоптоза. По данным анализа морфологических изменений, вызываемых этопозидом, АИ не превышал 7% для клеток линии Namalwa и составил 30% для клеток линии СЕМ.

С помощью проточного цитофлуориметра в клетках линий Namalwa и МТ–4, обработанных флударабином, зарегистрировано появление пика гиподиплоидной ДНК (рис. 3). При концентрации флударабина 7 мкмоль/л АИ для клеток Namalwa через 24 ч составлял лишь 5%, тогда как через 72 ч он достигал 25%. При такой же концентрации препарата АИ для клеток линии МТ–4 составил 5% через 24 ч и 14% — через 72 ч. При использовании этопозидом значения АИ приближались к 13% через 18 ч инкубации клеток линии Namalwa, тогда как при такой же продолжительности культивирования клеток СЕМ с этопозидом в оптимальной для индукции апоптоза дозой АИ достигал 70%. Во всех анализируемых случаях АИ, рассчитанный по данным цитофлуориметрии, был существенно выше, чем АИ, полученный по результатам морфологического исследования.

Для подтверждения апоптической природы гибели клеток под действием химиопрепаратов проводили электрофоретическое разделение ДНК клеток в агарозном геле. При этом специфичные для апоптоза межнуклеосомные фрагменты после инкубации с флударабином в дозе 35 мкмоль/л на протяжении 72 ч выявляли только в клетках Namalwa (рис. 4), хотя морфологические признаки апоптоза наблюдали в клетках обеих линий. Ранее было установлено, что при электрофорезе ДНК, полученной из обработанных этопозидом клеток СЕМ, межнуклеосомные фрагменты ДНК четко видны при концентрации этопозидом не ниже 80 мкмоль/л и инкубации клеток с препаратом на протяжении 18 ч. Отметим, что в таких условиях около 65% клеток окрашивается трипановым синим. Можно предположить, что, по крайней мере, в данной системе появление межнуклеосомных разрывов ДНК происходит на относительно поздних этапах апоптоза, когда в культуре накапливается значительное количество мертвых клеток. В образцах ДНК из клеток Namalwa, проинкубированных с этопозидом в таких же условиях, не выявлено характерной апоп-

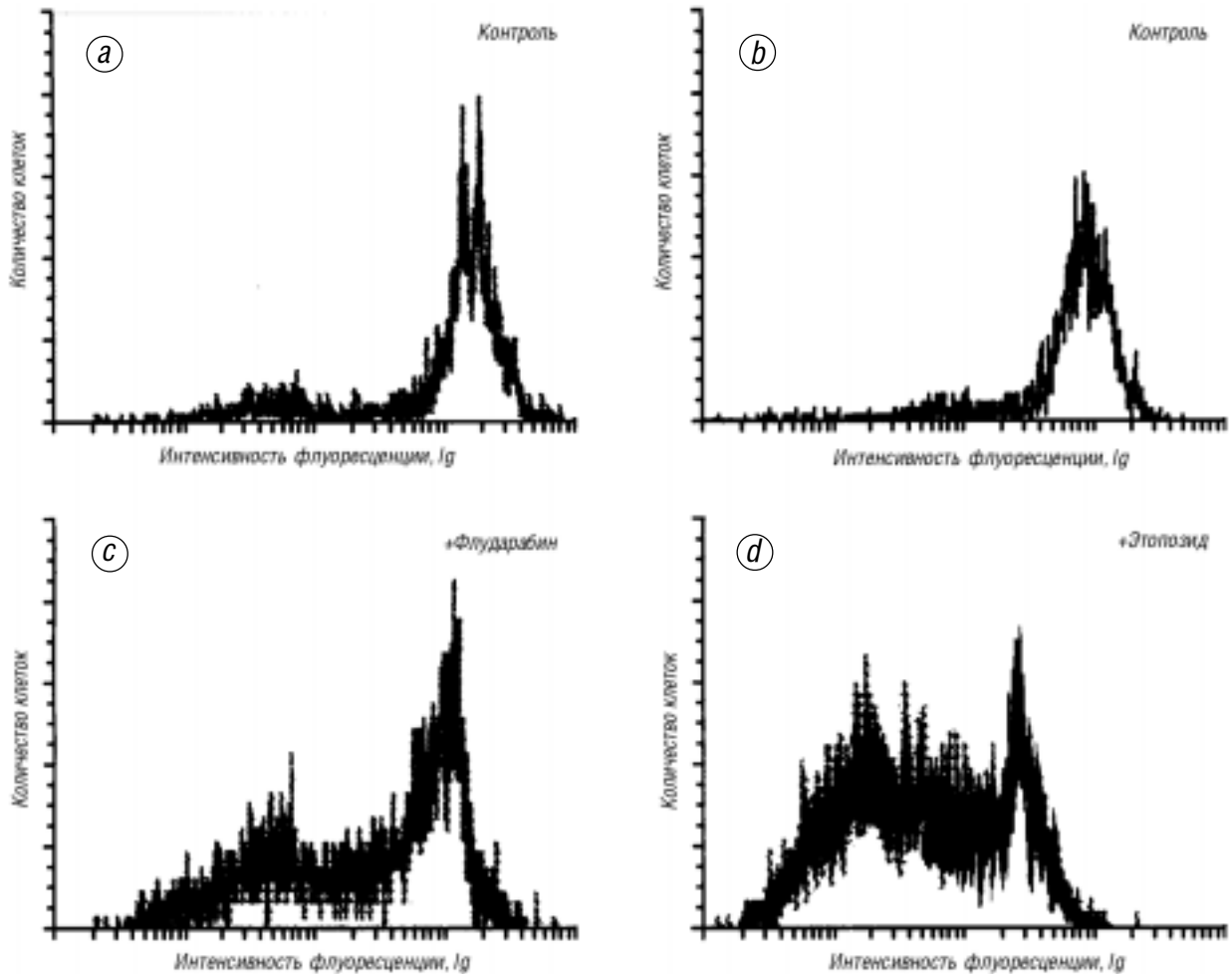


Рис. 3. Распределение ДНК ядер клеток линий МТ–4 (а, в) и СЕМ (б, г) по результатам цитофлуориметрического анализа. В верхнем правом углу указаны условия обработки клеток

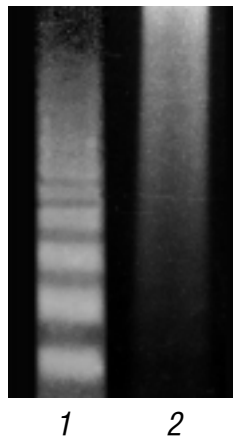


Рис. 4. Электрофорез ДНК, выделенной из клеток Namalwa (1) и МТ–4 (2), после их обработки флударабином в дозе 35 мкмоль/л на протяжении 72 ч

тической “лесенки”. Межнуклеосомной фрагментации ДНК также не было обнаружено при инкубировании этих клеток в бессывороточной среде на протяжении 3 ч перед внесением этопозидом либо в клетках, которые спонтанно погибали в условиях длительного культивирования без смены среды. Вполне вероятно, что отсутствие видимых полос фрагментированной ДНК может быть связано с малым количеством апоптических клеток в исследуемых препаратах, что не позволяет выявить их ме-

тодом электрофореза ДНК. В случае использования флударабина нельзя также исключить образования фрагментов ДНК, которые могут быть разделены только с помощью пульс-электрофореза, как это описано для лимфоцитов у больных с хроническим лимфолейкозом, которые прошли курс лечения флударабином [5].

При изучении действия ионов цинка на клетки Namalwa было показано, что цитотоксический эффект цинка сульфата проявляется лишь в дозах свыше 200 мкмоль/л (24 ч инкубации). В то же время предварительная обработка этих клеток цинка сульфатом в нетоксичной концентрации (40 мкмоль/л) приводила к статистически достоверному ($P < 0,05$) уменьшению индекса выживания клеток при последующей инкубации с этопозидом (таблица). Подобный эффект катионов цинка был обнаружен и в отношении клеток линии МТ–4. Вместе с тем, цинка сульфат практически не оказывал влияния на гибель клеток линий Namalwa или МТ–4, индуцированную флударабином. Эти предварительные результаты свидетельствуют о том, что способность ионов цинка усиливать цитотоксическое действие ДНК-повреждающих препаратов, скорее всего зависит от типа индуктора апоптоза, а не от типа клеток-мишеней.

Таблица Индекс выживания клеток Namalwa и МТ–4, предобработанных цинка сульфатом (40 мкмоль/л) или интактных, после инкубации с этопозидом и флударабином (средние значения трех экспериментов)

Препарат	Клетки линии Namalwa		Клетки линии МТ–4	
	+ Zn ²⁺	– Zn ²⁺	+ Zn ²⁺	– Zn ²⁺
Этопозид	45 ± 4*	65 ± 5	25 ± 5*	45 ± 4
	43 ± 5*	70 ± 4	28 ± 2*	47 ± 4
	56 ± 2*	75 ± 2	21 ± 4*	43 ± 5
Флударабин	33 ± 3	30 ± 3	25 ± 4	26 ± 5
	28 ± 3	28 ± 3	37 ± 2	35 ± 2
	24 ± 6	25 ± 6	20 ± 3	22 ± 6

* $P < 0,05$ для клеток, предобработанных и не обработанных цинка сульфатом.

Известно, что в сложной цепи событий В–клеточного лимфогенеза важное место занимает экспрессия генов ВЭБ [7]. Белок LMP1 ВЭБ способен индуцировать экспрессию антиапоптотических клеточных генов *bcl-2* и *A20*, а антисмысловые олигонуклеотиды против гена *LMP1* стимулируют апоптоз ВЭБ–иммортиализованных В–лимфоцитов [6]. Можно предположить, что выявленная нами резистентность В–клеточных линий к этопозиду обусловлена наличием в их геноме генов ВЭБ. Однако в случае флударабина клетки линии Namalwa, содержащие ВЭБ, сохраняют чувствительность к индукции апоптоза. Мы связываем такие различия с участием определенных каспаз в краткосрочном, но не в отсроченном апоптозе. Показано, что одним из ранних событий при инициации апоптоза этопозидом является активация в клетках каспазы–3 [9]. В то же время предобработка панкаспазным ингибитором z-VAD.fmk лимфоцитов больных с хроническим лимфолейкозом практически не влияет на апоптоз, вызываемый флударабином [8, 10]. Скорее всего влияние солей цинка на апоптоз, индуцированный химиопрепаратами, также зависит от активации каспазы–3. Между тем показано, что цинк обладает как анти-, так и проапоптотической активностью [11]. Механизмы такого разнонаправленного действия ионов цинка пока не известны.

Таким образом, обнаружено, что индукция апоптоза флударабином требует значительно большего времени, чем индукция этопозидом. Апоптоз–индуцирующее действие флударабина было показано не только на В–, но и на Т–клеточных лимфомах человека. Относительная резистентность В–клеточных линий к индукции апоптоза, обусловленная наличием в их геноме антиапопти-

ческих генов ВЭБ, проявляется только в случае использования этопозидов. Предварительная обработка клеток Namalwa и МТ–4 ионами цинка повышает их чувствительность к действию этопозидов, но не флударабина. По–видимому, индукция апоптоза флударабином и этопозидом осуществляется с участием различных молекулярных механизмов, что требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершанович МЛ, Филов ВА, Акимов МА, Акимов АА. Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей. Сотис, Санкт-Петербург, 1999. 152 с.
2. Фильченков АА, Стойка РС. Апоптоз и рак. Морион, Киев, 1999. 184 с.
3. Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grunke M, Woith W, Kalden JR. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. Nucl. Acid Res 1994; **22**: 5506-7.
4. Butenko ZA, Zavelevich MP, Smirnova IA, Khaetsky IK, Phylchenkov AA, Kishinskaya EG, Baranovskaya LN. Different etoposide-induced apoptotic response of human malignant lymphoid cell lines. Exp Oncol 2000; **22**: 26-31.
5. Huang P, Robertson LE, Wright S, Plunkett W. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. Clin Cancer Res 1995; **1**: 1005-13.
6. Kenney JL, Guinness ME, Curiel T, Lacy J. Antisense to the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) suppresses LMP1 and *bcl-2* expression and promotes apoptosis in EBV-immortalized B cells. Blood 1998; **92**: 1721-7.
7. Klein G, Klein E. Epstein-Barr virus and human lymphomas. In: Canellos G, Lister T, Sklar J, eds. The Lymphomas. Philadelphia: WB Saunders Comp, 1998: 63-73.
8. Pettitt AR, Cawley JC. Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2000; **109**: 800-4.
9. Sleiman RJ, Stewart BW. Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G₂-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. Clin Cancer Res 2000; **6**: 3756-65.
10. Stoetzer OJ, Pogrebniak A, Scholz M, Pelka-Fleischer R, Gullis E, Darsow M, Nussler V, Wilmanns W. Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 1999; **13**: 1873-80.
11. Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. Ann Clin Lab Sci 1995; **25**: 134-42.