

2. *Gerald, J. S.* Модели несчастного случая: гомеостазис риска // Энциклопедия безопасности труда МОТ, 2004.
3. *Хлопун, Г. В.* Влияние умственного труда на главные физиологические функции организма и, в частности, на газообмен / Г. В. Хлопун // Гигиена труда. – 1923. – № 3–4, – С. 12–18.
4. *Довгуша, В. В.* Отдых на этапах учебно-боевой деятельности подводников / В. В. Довгуша, И. Л. Мызников. – СПб. : ФГУП НИИ промышленной и морской медицины, 2006. – 94 с.
5. Методика контроля за функциональным состоянием моряков. Диагностические индексы и физиологические нагрузочные тесты : пособие для врачей / под общей ред. И. Л. Мызникова. – Мурманск: Север, 2008. – С. 8–10.
6. Оценка функционального состояния системы кровообращения у работников энергетического комплекса / А. Г. Братухин [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 8. – С. 112–116.
7. *Чуян, Е. М.* Комплексный подход к оценке функционального состояния студентов / Е. М. Чуян, Е. А. Бирюкова, М. Ю. Раваева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2008. – Т. 21. – № 1. – С. 123–129.
8. Вариабельность сердечного ритма. Стандарты измерения, физиологическая интерпретация и клиническое использование : руководство // *European Heart Journal*. – 1996. – Vol. 17. – P. 354–381.

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В РАЗВИТИИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПО КАСПАЗО-ЗАВИСИМОМУ МЕХАНИЗМУ В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

ROLE OF METALLOTHIONEINES IN THE DEVELOPMENT OF CASPASE-DEPENDENT APOPTOTIC PROCESSES IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

А. В. Тамашевский, Ю. М. Гармаза, Е. И. Белевич, Е. И. Слобожанина
A. Tamashevski, Y. Harmaza, K. Bialevich, E. Slobozhanina

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь
tayzoe@gmail.com*

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

Проведена оценка активности цистеиновой протеазы – каспазы-3 и уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотиионеинов в лимфоцитах пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ) до и после модификации их редокс-статуса. В лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкоэмических клетках приводил к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому механизму. Установлено, что основным триггером в этом процессе могут выступать металлотиионеины, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза ионов цинка в лимфоцитах человека, в том числе и при В-ХЛЛ.

The activity of cysteine protease – caspase-3 and the expression of cysteine-containing low molecular weight proteins – metallothioneins in lymphocytes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) were evaluated before and after modification of their redox status. An increased caspase-3 activity was detected in lymphocytes of patients with B-CLL compared to normal cells. H₂O₂-induced oxidative stress in leukemic cells led to the activation of caspase-dependent apoptotic processes. It has been established that metallothioneins are the main triggers in this process and these proteins play a significant role in maintaining the zinc homeostasis in cells including leukemic.

Ключевые слова: хронический лимфоцитарный лейкоз, металлотиионеины, каспаза-3, редокс-статус, цинковый гомеостаз.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, metallothioneins, caspase-3, redox-state, zinc homeostasis.

Одним из предполагаемых путей развития устойчивости опухолевых клеток к действию ксенобиотиков является увеличение содержания внутриклеточных тиолов, таких как глутатион и металлотиионеины (MTs), которые связывают компоненты, токсичные для клетки. MTs млекопитающих представляют собой суперсемейство неэнзиматических полипептидов (молекулярная масса 6–7 кДа) с высоким содержанием цистеина, серы и металлов (тиолатные кластеры металлов). Именно благодаря своей уникальной структуре данные белки способны

связывать ионы металлов и активные формы кислорода (АФК). Это свойство используется во многих реакциях и, таким образом, МТs могут выполнять важные функции в различных биохимических сигнальных каскадах [1]. На сегодняшний день не вызывает сомнения защитная роль МТs при апоптозе [1–3]. В работе [2] обнаружена повышенное содержание МТs в опухолевых клетках по периферии очага, что связано с высоким уровнем клеточной пролиферации. Такая экспрессия МТs в строме опухоли связана с её разрастанием, поскольку именно строма отвечает за рост опухоли и её агрессивность. Авторы сделали вывод, что строма злокачественной опухоли с высоким уровнем МТs защищает себя от апоптоза. При воздействии клинически значимых концентраций доксорубина (DOX) на первичную культуру кардиомиоцитов, полученную из сердечной мышцы трансгенных новорожденных мышей, а также на культуру кардиомиоцитов от нетрансгенных животных (контроль), был выявлен высокий уровень апоптотических клеток в контроле, в то же время процессы апоптоза значительно подавлялись в трансгенных кардиомиоцитах со сверхэкспрессией МТs. При этом в контрольных кардиомиоцитах наблюдался выход цитохрома *c* из митохондрий и активация каспазы-3 на фоне значительного содержания в них АФК [3]. При этом DOX активировал p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), участие которой является критически важным для запуска процесса апоптоза. МТs значительно ингибировали DOX-активированную p38 MAPK, при этом антиапоптотический эффект был намного более выраженным, чем в случае обработки кардиомиоцитов специфическим ингибитором p38 MAPK – SB203580 [4]. Авторы предположили, что МТs ингибируют не только p38 MAPK-опосредованный путь, но и другие сигнальные каскады процесса апоптоза, запускаемые в ответ на DOX-индуцированный окислительный стресс [3]. Один из таких путей включает в себя активацию каспазы-3, которая происходит при выходе цитохрома *c* из митохондрий под действием окислительного стресса [5]. Выход цитохрома *c* из митохондрий приводит к формированию сложного комплекса (апоптосомы), состоящего из молекул цитохрома *c*, Araf-1 (dATP-dependent apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазы-9, в котором неактивная прокаспаза-9 превращается в активную каспазу-9. Далее каспаза-9 протеолитически расщепляет прокаспазу-3 до активной каспазы-3 [6]. Дальнейшее развитие процесса апоптоза связано с опосредованным каспазой-3 расщеплением различных белков клетки. Таким образом, как МТs, так и каспаза-3 являются участниками запуска апоптотического процесса в патологических клетках.

Целью данной работы явилось определение активности цистеиновой протеазы – каспазы-3 и содержания уровня металлотионеинов в лимфоцитах пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом до и после модификации их редокс-статуса.

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров ($n = 6$), полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ и пациентов с диагнозом хронический В-лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ, $n = 8$), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница». Все образцы крови были в консерванте «гепарин».

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) изолировали в градиенте гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300g, 30 мин) и отмывок в 10 mM фосфатном буфере pH 7,4 (PBS). После выделения клетки помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 mM L-глутамин и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5 %-ным содержанием CO₂ при температуре 37 °C с агентами, модифицирующими окислительно-восстановительный баланс: пероксидом водорода (H₂O₂) концентрации 100 мкМ, N-ацетилцистеином (НАС) в концентрации 200 мкМ и хлоридом цинка (ZnCl₂) в концентрации 50 мкМ.

Для оценки содержания МТs I/II типов ПМНК фиксировали 2 %-м раствором параформальдегида (60 мин, $t = 4 \pm 2$ °C), отмывали путем центрифугирования (300g, 15 мин) и проводили пермеабиллизацию 0,5 %-м раствором детергента твин 20 в PBS буфере (10 мин, $t = 4 \pm 2$ °C). Далее проводили последовательную инкубацию клеток с моноклональными антителами анти-металлотионеин UC1MT (12 ч, $t = 4 \pm 2$ °C) и с их вторичными антителами – анти-козлинными IgG1-FITC (2 ч, $t = 4 \pm 2$ °C). В качестве изотипического контроля использовали мышиные антитела IgG1, которые параллельно инкубировали с исследуемыми клетками при вышеописанных условиях. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson) в FL1-H канале и по отношению интенсивности флуоресценции комплекса МТ-UC1MT-FITC к интенсивности флуоресценции изотипического контроля (IgG1-FITC) судили о степени экспрессии данного белка в исследуемых клетках.

Оценку активности каспазы-3 в периферических лимфоцитах проводили с помощью набора реагентов Casp-Glow™ по стандартному протоколу производителя. Для этого суспензию ПМНК инкубировали с субстратом FITC-DEVD-fmk в 10 mM HEPES-буфере pH 7,4 (60 мин, $t = 37$ °C). Измерения интенсивности флуоресценции образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson) в FL1-H канале. Об активности каспазы-3 судили по интенсивности флуоресценции FITC-DEVD.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Каспаза-3 относится к семейству цистеиновых аспартат-зависимых протеаз, которые в норме представлены в виде неактивных предшественников – прокаспазы-3 с молекулярным весом 32 кДа, после активации каспаза-3 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой 17 и 12 кДа, соответственно. Для оценки активности каспазы-3 в данной работе нами был использован свободнопроникающий в клетку FITC-меченный субстрат DEVD-fmk (Asp-Glu-Val-Asp-fmk), при расщеплении которого каспазой-3 в анализируемом образце можно регистрировать флуоресценцию. На рис. 1 представлены репрезентативные диа-

граммы распределения интенсивности флуоресценции субстрата каспазы-3 FITC-DEVD в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ. Установлено, что содержание интактных клеток в суммарной популяции лейкозных лимфоцитов, не окрашенных субстратом для каспазы-3 (жизнеспособных клеток), составляло в среднем 75–85 %, т. е. 15–25 % интактных клеток находится в стадии апоптоза (рис. 1А). Стоит отметить, что для лимфоцитов доноров данный параметр составлял в среднем 5–10 %, что указывает на повышенное развитие процессов спонтанного апоптоза в клетках пациентов при В-ХЛЛ.

Для модификации редокс-баланса в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ были использованы: хлорид цинка, пероксид водорода и НАС. Известно, что ионы цинка участвуют в защите биологических структур от окислительного стресса путем поддержания определенного уровня глутатиона и количества МТs, взаимодействуя с ионами других переходных металлов и т.д. С другой стороны, при увеличении внутриклеточной лабильной концентрации Zn^{2+} на 50 нМ данный микроэлемент проявляет прооксидантные свойства [7]. В случае модуляции клеточного редокс-статуса пероксидом водорода окислительные процессы начинаются незамедлительно после его добавления и быстро достигают плато в отличие от эффектов, индуцированных трет-бутилгидропероксидом, которые развиваются медленно и усиливаются со временем. В свою очередь НАС является одним из предшественников восстановленного глутатиона и может достаточно быстро накапливаться в клетках и диацетилироваться, что приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации цистеина данных низкомолекулярных тиолов.

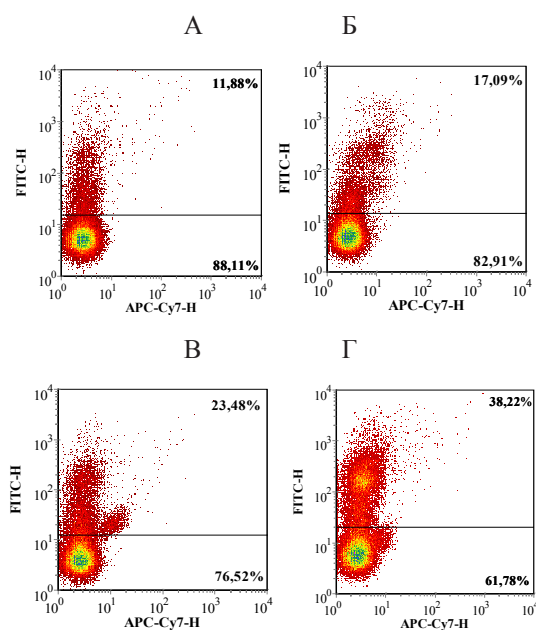


Рисунок 1 – Репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции субстрата каспазы 3 FITC-DEVD в лимфоцитах пациента при В-ХЛЛ: А – диаграмма распределения интенсивности флуоресценции FITC-DEVD в интактных лимфоцитах пациента с В-ХЛЛ (контроль); Б – после воздействия $ZnCl_2$ (50 мкг/мл); В – после воздействия НАС (200 мкМ); Г – после воздействия H_2O_2 (100 мкМ); (по оси ординат – интенсивность флуоресценции FITC-DEVD в отн.ед.)

Таким образом, установлено, что инкубация *in vitro* лейкозных лимфоцитов с хлоридом цинка в течение 24 ч приводит к незначительному снижению количества жизнеспособных клеток в среднем на 5–10 % (рис. 1Б) по сравнению с интактными клетками (рис. 1А), однако данные оказались статистически не достоверными. В свою очередь, модификация редокс-баланса в лейкозных клетках с помощью НАС и H_2O_2 сопровождалась снижением процентного содержания жизнеспособных клеток в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ соответственно в среднем на 10–15 % и 20–25 % (рис. 1В и 1Г) по сравнению с интактными лейкозными клетками, причем для H_2O_2 полученные результаты оказались статистически значимыми.

Параллельно в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ была проведена оценка содержания МТs. Установлено, что содержание МТs в интактных лейкозных лимфоцитах находится в диапазоне $8,9 \pm 1,7$ (отношение интенсивности флуоресценции моноклонального антитела против металлотиионенинов UC1MT-IgG1-FITC к интенсивности флуоресценции изотипического контроля к UC1MT IgG1-FITC). После инкубации клеток с хлоридом цинка происходит статистически достоверное увеличение содержания данных белков в среднем в 2,5–3,1 раза по сравнению с интактными клетками (рис. 2). Полученный результат указывает на значительную роль МТs в поддержании гомеостаза цинка в лейкозных лимфоцитах. Смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону антиоксидантов с помощью НАС не вызывало изменения в содержании МТs в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ по сравнению с интактными клетками (рис. 2). H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс приводил к статистически достоверному снижению уровня экспрессии МТs в лейкозных клетках в среднем на 20–25 % (рис. 2).

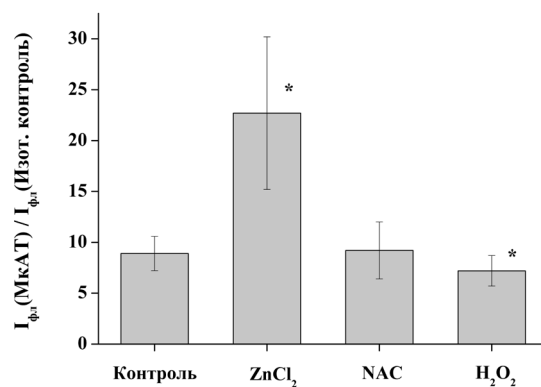


Рисунок 2 – Экспрессия металлотионеинов I/II изоформ в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ после воздействия на них ZnCl₂, NAC и H₂O₂: I_{φ1} (MкАТ) – интенсивность флуоресценции специфических моноклональных антител UC1MT против металлотионеинов I и II изоформы; I_{φ1} (Изот. контроль) – интенсивность флуоресценции антител IgG1 (изотипического контроля) для моноклональных антител UC1MT против металлотионеинов I и II изоформы; * – различия по сравнению с интактными лимфоцитами (контроль) достоверны ($p < 0,05$)

Проведенный корреляционный анализ между содержанием МТs в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия H₂O₂ и количеством клеток, не окрашенных субстратом каспазы-3, установил статистически значимую обратную зависимость ($R = -0,89$; $p = 0,016$). Данный факт указывает на участие МТs в запуске апоптотических процессов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ при H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе. Этот результат хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о сниженной чувствительности лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ к воздействию H₂O₂ по сравнению с нормальными клетками [8], т.к. в лимфоцитах здорового человека содержание МТs в среднем в 2 раза превышает таковое у лейкозных клеток.

Таким образом, в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкозных клетках приводит к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому пути. Основным триггером в этом процессе могут выступать цистеин-содержащие низкомолекулярные белки металлотионеины, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза цинка в лимфоцитах человека, в том числе и при В-ХЛЛ.

Авторы благодарят заведующую лабораторией механизмов клеточной лекарственной резистентности РНПЦ Трансфузиологии и медицинских биотехнологий, к.б.н. Пасюкова В. В. за предоставленные образцы крови пациентов с В-ХЛЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гармаза, Ю. М. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль / Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. И. Слобожанина // Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 1. – С. 107–116.
2. Dutsch-Wicherek, M. The possible biological role of metallothionein in apoptosis / M. Dutsch-Wicherek, J. Sikora, R. Tomaszewska // Front Biosci. 2008. – № 13. – P. 4029–4038.
3. Wang, G. W. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes / G. W. Wang, J. B. Klein, Y. J. Kang // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2001. – Vol. 298. – № 2. – P. 461–468.
4. Kang, Y. J. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases / Y. J. Kang, Z. X. Zhou, G. W. Wang, A. Buridi [et al.] // J Biol Chem. – 2000. Vol. 275. – № 18. – P. 13690–13698.
5. Pan, G. Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro / G. Pan, E. W. Humke, V. M. Dixit // FEBS Lett. 1998. – Vol. 426. – № 1. – P. 151–154.
6. Ma, Y. Cupric nitrotriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome C from mitochondria, and activation of caspase-3 / Y. Ma, T. Ogino, T. Kawabata, J. Li [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27. – № 1–2. – P. 227–233.
7. Гармаза, Ю. М. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты / Ю. М. Гармаза, Е. И. Слобожанина // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – Вып. 2. – С. 322–337.
8. Тамашевский, А. В. Биофизические механизмы регуляции активности мембранных белков, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью лимфоцитов человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.02 / А. В. Тамашевский. – Минск : ИБиКИ, 2014. – 23 с.