

7. Dauber K. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. / K. Dauber, D. Becker, M. Odendahl // *Cytotherapy*. – 2011. – №2. – С. 449-458.

8. Zhang L. Short Bio-Active Peptides for Promoting Wound Healing / L. Zhang, R. Carmichael // *Helix biomedix*. – 2017. – С. 11-16.

УДК 577.3,32/.36; 577.334

**Гармаза Ю.М., Белевич Е.И., Тамашевский А.В.
ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И АКТИВНОСТИ
КАСПАЗЫ-3 В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ
ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ДО И ПОСЛЕ МОДИФИКАЦИИ
РЕДОКС-БАЛАНСА**

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”,
г. Минск, Республика Беларусь

**Harmaza Y.M., Bialevich K.I., Tamashevski A.V.
STUDY OF METALLOTIONEINES EXPRESSION AND CASPASE-3
ACTIVITY IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH B-CHRONIC
LYMPHOCYTIC LEUKEMIA BEFORE AND AFTER REDOX-STATE
MODIFICATION**

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

Аннотация. Проведена оценка активности цистеиновой протеазы – каспазы-3 и уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотioneинов 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 металлотioneины, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза ионов цинка в лимфоцитах человека, в том числе и при В-ХЛЛ.

Annotation. 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, металлотионеины, каспаза-3, редокс-статус, цинковый гомеостаз

Key words: chronic lymphocytic leukemia, metallothioneins, caspase-3, redox-state, zinc homeostasis

Введение

Одним из предполагаемых путей развития устойчивости опухолевых клеток к действию ксенобиотиков является увеличение содержания внутриклеточных тиолов, таких как глутатион и металлотионеины (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, MTs могут выполнять важные функции в различных биохимических сигнальных каскадах [1]. На сегодняшний день не вызывает сомнения защитная роль MTs при развитии апоптоза [1–3], при этом, показано, что каспаза-3 также является участником в его запуске в патологических клетках [4].

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.

Материалы и методы исследования

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). После выделения клетки помещали в питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% 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), N-ацетилцистеином (NAC) и хлоридом цинка.

Для оценки содержания MTs I/II типов использовали первичные моноклональные антитела анти-металлотионеин UC1MT и вторичными антитела – анти-козлиными IgG1-FITC. В качестве изотипического контроля использовали мышинные антитела IgG1. Измерения проводили на проточном

цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson) в FL1-H канале и по отношению интенсивности флуоресценции комплекса MT-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 CaspGlowTM по стандартному протоколу производителя. Измерения интенсивности флуоресценции образцов проводили также 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 $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

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. 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. 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. Показано, 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% по сравнению с интактными клетками, однако данные оказались статистически не достоверными. В свою очередь, модификация редокс-баланса в лейкозных клетках с помощью НАС и H₂O₂ сопровождалась снижением процентного содержания жизнеспособных клеток в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ соответственно в среднем на 10–15% и 20–25% по сравнению с интактными лейкозными клетками, причем для H₂O₂ полученные результаты оказались статистически значимыми.

Параллельно в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ была проведена оценка содержания MTs. Установлено, что содержание MTs в интактных лейкозных лимфоцитах находится в диапазоне $8,9 \pm 1,7$ (отношение интенсивности

флуоресценции моноклонального антитела против металлотioneинов 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. Полученный результат указывает на значительную роль MTs в поддержании гомеостаза цинка в лейкозных лимфоцитах. Смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону антиоксидантов с помощью НАС не вызывало изменения в содержании MTs в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ по сравнению с интактными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс приводил к статистически достоверному снижению уровня экспрессии MTs в лейкозных клетках в среднем на 20–25%.

Проведенный корреляционный анализ между содержанием MTs 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 MTs 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 [5], т.к. в лимфоцитах здорового человека содержание MTs в среднем в 2 раза превышает таковое у лейкозных клеток.

Выводы: 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 металлотioneины, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза цинка в лимфоцитах человека, в том числе и при В-ХЛЛ.

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

Список литературы:

1. Гармаза, Ю.М. Металлотioneины млекопитающих: структура и биологическая роль / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слободжанина // 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. Cupric nitrilotriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome C from mitochondria, and activation of caspase-3 / Y. Ma [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol.27, № 1–2. – P. 227–233.

5. 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. Мн. : ИБиКИ, 2014. 23 с.

УДК 612.1/.8

**Гитман Т.А., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЛЛОГЕННЫХ ММСК НА
РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО
СМОДЕЛИРОВАННОГО ВТОРИЧНОГО БИЛИАРНОГО ЦИРРОЗА
ПЕЧЕНИ**

Кафедра патологической физиологии
Уральский государственный медицинский университет
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Российская Федерация

**Gitman T.A., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.
STUDY OF THE EFFECTS OF ALLOGENEIC MMSC ON LIVER
REGENERATION UNDER EXPERIMENTAL SIMULATED SECONDARY
BILIARY CIRRHOSIS**

Department of pathological physiology
Ural state medical university
«Institute of medical cell technologies»
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: cardinalis14@gmail.com

Аннотация. Целью настоящего исследования было оценить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на изменения биохимических показателей крови в условиях цирроза печени. Через две недели после перевязки общего желчного протока и подтверждения развившегося цирроза, опытной группе мышей в хвостовую вену вводились ММСК в дозе 4 млн кл./кг массы тела. После выведения животных из эксперимента проводилось сравнение биохимических показателей крови контрольной и экспериментальной групп.

Ключевые слова: цирроз печени, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, биохимические показатели крови.