

## УЧАСТИЕ АУТОКРИННЫХ ФАКТОРОВ В ЗАЩИТЕ КЛЕТОК ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ЛИНИИ CTLL-2 ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

**© Г. В. Луценко, М. В. Гречихина, Л. Г. Дьячкова**

*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;  
электронный адрес: gylut@mail.ibch.ru*

Исследовали роль аутокринных полипептидных факторов (АПФ), секретируемых наряду с пируватом клетками цитотоксической ИЛ-2-зависимой линии CTLL-2, в защите клеток от окислительного стресса. Внесение в культуру клеток CTLL-2 вместе с пероксидом водорода ( $H_2O_2$ ) кондиционированной среды (КС), содержащей пируват и АПФ, значительно повышало их выживание в условиях окислительного стресса. Получена кинетика удаления  $H_2O_2$  из клеточных культур при окислительном стрессе в случае добавления КС. Показано, что на начальном этапе окислительного стресса (до 15 мин) удаление  $H_2O_2$  происходит главным образом за счет его реакции с пируватом, содержащимся в КС. Определено содержание пируата в КС, которое составляет  $138 \pm 7$  мкМ. Для удаления пируата из КС была использована гель-фильтрация на колонке с гелем Bio-Gel P-10. В результате гель-фильтрации были получены три фракции КС (*A*, *B* и *C*), соответствующие трем различным пикам на хроматограмме. Ни в одной из фракций пируата не обнаружили. Фракция *A* выходила из колонки первой, она содержала самые крупные молекулы. В тесте клеточного выживания было показано, что самой высокой защитной способностью при окислительном стрессе клеток CTLL-2 обладает фракция *B*. Фракция *A* в меньшей степени поддерживала выживание клеток, а фракция *C* не обладала защитной способностью вообще. Установлено, что добавление фракции *B* к клеткам приводит к сохранению в них уровня АПФ при окислительном стрессе на более высоком уровне, чем в контроле. Более того, показано, что АПФ, входящие во фракцию *B*, способны непосредственно реагировать с  $H_2O_2$  и инактивировать его в отсутствие клеток. Аутокринные полипептидные факторы, входящие во фракцию *A*, подобными свойствами не обладали.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, пероксид водорода, аутокринные факторы, пируват, выживание клеток, АТФ, антиоксиданты.

**Принятые сокращения:** АПФ — аутокринные полипептидные факторы, АФК — активные формы кислорода, ИЛ — интерлейкин, КС — кондиционированная среда, МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид.

Клетки млекопитающих *in vivo* постоянно сталкиваются в процессе своей жизнедеятельности с активными формами кислорода (АФК), которые генерируются аэробным метаболизмом, лекарственными препаратами и другими ксенобиотиками, образуются в процессе облучения ионизирующей радиацией. При воспалительной реакции стимулированные нейтрофилы и макрофаги выбрасывают АФК, которые наряду с клетками-мишениями поражают нормальные клетки, находящиеся в зоне воспаления. Основной формой АФК, ответственной за окислительный стресс, является  $H_2O_2$ . Наряду с выполнением роли эффекторного звена при поражении клеток-мишений  $H_2O_2$ , образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке (Плетюшкина и др., 2006). Кроме широко известных механизмов защиты клеток от  $H_2O_2$  с участием клеточных ферментов каталазы и глутатионпероксидазы (Nathan et al., 1980; O'Donnell-Tormey et al., 1985; Makino et al., 1994) в литературе описан еще один механизм, который состоит в секреции пируата — субстрата цикла трикарбоновых кислот — во внеклеточную среду. Пируват, вступая в реакцию с  $H_2O_2$  и превращаясь в ацетат, удаляет его из

среды (O'Donnell-Tormey et al., 1987; Desagher et al., 1997; Wang, Cynader, 2001), т. е. действует как антиоксидант.

В многоклеточном организме выживание клеток находится под контролем множества цитокинов различной природы. Такой контроль необходим для поддержания гомеостаза тканей, который достигается за счет баланса между скоростями клеточной пролиферации и клеточной гибели. Цитокины, являющиеся полипептидными факторами, могут оказывать сигнальное действие на клетку-продуцент (аутокринные факторы) или на клетку другого типа (параокринные факторы), контролируя метаболические процессы в этих клетках (Heldin, Westmark, 1990; Пальцев, Иванов, 1995). В настоящее время наименее изученными являются аутокринные факторы выживания. Эти факторы, не являясь факторами роста, действуют на те же клетки, которые их секретируют, и таким образом участвуют в поддержании их выживания (Ishizaki et al., 1993, 1994; Tumber et al., 2000). Факторы выживания являются полипептидами, и мы в дальнейшем будем использовать термин «аутокринные полипептидные факторы» (АПФ), для того чтобы отличать их от метаболитов

(пируват) или антиоксидантов (глутатион), также секретируемых клетками в окружающую среду.

Ранее нами было установлено, что АПФ играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма и механизме контроля выживания Т-лимфоцитов (Луценко, Дьячкова, 2003; Луценко и др., 2005). Нами была разработана экспериментальная модель, позволяющая искусственно создавать дефицит АПФ в культуре и исследовать последствия такого дефицита для выживания и метаболизма культивируемых клеток (Луценко и др., 2001). Недавно с использованием этой модели мы исследовали влияние дефицита АПФ в культуре на состояние клеток линии CTLL-2 в процессе окислительного стресса. Было показано, что дефицит АПФ в культуре в условиях окислительного стресса вызывает снижение уровня внутриклеточного АТФ до крайне низких значений. Это приводит к отягощению клеточного стресса, что проявляется в усилении блеббинга клеточной поверхности, падении трансмембранных потенциала митохондрий и ускорении гибели клеток CTLL-2 по пути апоптоза или некроза (Луценко и др., 2007).

Представляло интерес исследовать влияние повышенной концентрации АПФ в культуре на выживание клеток цитотоксической ИЛ-2-зависимой линии CTLL-2 в условиях окислительного стресса и изучить возможный вклад АПФ в механизм защиты клеток от этого стресса, причем необходимо было отличить защитные эффекты АПФ от эффектов пирувата — метаболита, который наряду с АПФ секретируется клетками во внеклеточную среду.

В настоящей работе в качестве источника АПФ использовали кондиционированную среду (КС) клеток линии CTLL-2, содержащую в своем составе и пируват. Мы показали, что КС обладает значительным защитным эффектом при окислительном стрессе клеток CTLL-2, причем антиоксидантное действие пирувата проявляется в самом начале окислительного стресса. Проведение гель-фильтрации КС позволило удалить пируват и выявило неоднородность АПФ, содержащихся в КС. Показано, что одна из фракций КС обладает выраженным защитным действием на клетки CTLL-2 в условиях окислительного стресса, реагируя непосредственно с  $H_2O_2$  и удаляя его из среды.

## Материал и методика

**Клетки и среды.** Клетки ИЛ-2-зависимой линии CTLL-2 выращивали в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина (Sigma), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Serva, Германия), 50 мкг/мл гентамицина и 50—100 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2 (Биотех, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в 1 мл среды в 24-луночных планшетах (Costar, США) при 37 °C в атмосфере с 5 %  $CO_2$ . При проведении экспериментов использовали культуральную среду (рН 7.2—7.4) с добавлением 5 % сыворотки и 100 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2.

Выживание клеток определяли с использованием MTT-теста (Denizot, Lang, 1986) с некоторыми изменениями. Для проведения теста клетки осаждали в планшете центрифугированием (400 g, 5 мин) и стряхиванием удаляли надосадочную жидкость из лунок. После этого в лунки вносили по 30 мкл раствора MTT (Sigma, США), приготовленного на среде RPMI-1640 (0.5 мг/мл), и инкубировали 2 ч при 37 °C в атмосфере с 5 %  $CO_2$ . По истечении этого времени к содержимому каждой лунки добав-

ляли по 100 мкл диметилсульфоксида и растворяли кристаллы формазана, образованного в результате восстановления MTT живыми клетками. Измерение оптической плотности содержимого каждой лунки проводили на многоканальном спектрофотометре Multiscan MCC/340 (Titertek, Великобритания) на длине волн 540 нм. Выживание клеток оценивали по величине оптической плотности раствора формазана в каждой пробе.

Цельную КС получали в виде надосадочной жидкости культур клеток CTLL-2, культивируемых с начальной концентрацией  $1 \cdot 10^6$  кл./мл в течение 24 ч в среде с добавлением 5 % сыворотки и 200 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2. Среду для такой культуры приготавливали на основе среды RPMI-1640 с добавлением 0.25 мг/мл  $\beta$ -цикличодекстрина, 2 mM L-глутамина, 10 мкг/мл L-аланина,  $5 \cdot 10^{-7}$  М путресцина (Sigma, США),  $5 \cdot 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола и 50 мкг/мл гентамицина (Ohmori, 1988). КС для последующего фракционирования получали из культур, аналогичных указанным выше культурам, но без добавления сыворотки. Клетки перед внесением в такую культуру однократно отмывали средой RPMI-1640. Фракционировали КС путем ультрафильтрации через конические фильтры или посредством гель-фильтрации на колонке. По окончании фракционирования КС к полученным фракциям добавляли 5 % сыворотки.

Ультрафильтрацию КС проводили путем центрифугирования (400 g) с использованием конических фильтров CF50 и CF25 (Amicon, США). При этом концентрат CF50 подвергали отмыжке от пирувата и низкомолекулярных АПФ, разбавляя его 10-кратным объемом среды RPMI-1640, а затем проводя повторное центрифugирование.

Гель-фильтрацию КС проводили на колонке (0.8 × 75.0 см) с использованием геля Bio-Gel P-10 (Bio-Rad, США) в качестве носителя. Перед нанесением на колонку образец КС подвергали ультрафильтрации через конический фильтр CF25, проводя его центрифугирование при 400 g. Полученный фильтрат концентрировали на SpeedVac-концентраторе (Savant, США) до объема 0.3—0.5 мл и наносили на колонку. В качестве элюента использовали фосфатный буфер (рН 7.2—7.4). Содержание протеинов в элюате регистрировали по поглощению на длине волны 226 нм.

Концентрацию пирувата в КС определяли по его превращению в лактат под действием лактатдегидрогеназы в присутствии NADH (O'Donnell-Tormey et al., 1987) и регистрировали по изменению поглощения света на длине волны 340 нм с использованием спектрофотометра DU-640 (Beckman, США). Для измерения концентрации пирувата в одном растворе приготавляли по два образца, добавляя по 100 мкл тестируемого раствора к 0.4 мл фосфатного буфера (рН 7.4), который содержал 50 мкг NADH (Sigma, США). Проводили измерение исходного поглощения света одним образцом, затем добавляли ко второму образцу 5 Ед/мл лактатдегидрогеназы (Sigma, США) и после короткой инкубации (1—2 мин) проводили второе измерение. Концентрацию пирувата определяли по разнице показаний этих двух измерений, сравнивая с показаниями, полученными для стандартного раствора пирувата (Sigma, США).

Содержание  $H_2O_2$  в среде оценивали с помощью многоканального спектрофотометра Multiscan MCC/340 по поглощению света на длине волны 450 нм, используя пероксидазу хрена (Sigma, США) и 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma, США) в качестве хромогенного субстрата (Goka, Farthing, 1987; Nowak, 1990). TMB рас-

твояли в концентрации 1 мМ в буфере следующего состава: 10 мМ цитрата натрия, 20 % диметилформамида, 1.25 % полиэтиленгликоля (Sigma, США) и 10 мМ моногидрата лимонной кислоты. Исследуемый образец среды смешивали в равных объемах (50 мкл) с раствором ТМВ, содержащим 5 Ед/мл пероксидазы хрена, и после инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре останавливали реакцию добавлением 50 мкл 10%-ной серной кислоты, а затем проводили измерение. В экспериментах по определению кинетики удаления пероксида водорода из культур образцы среды, содержащие  $H_2O_2$ , по истечении требуемого времени извлекали из лунок планшета, замораживали и хранили до момента тестирования.

Содержание АТФ в клетках определяли люциферин-люциферазным методом с использованием стандартного набора реагентов (Sigma, США) на биолюминометре Triathler (Hidex, Финляндия).

**Статистическая обработка.** Количество повторов для каждой экспериментальной точки составляло 2—4. Все опыты были повторены не менее 3 раз. На всех графиках указаны средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что многие опухолевые линии и нормальные фибробlastы (O'Donnell-Tormey et al., 1987), а также астроциты (Wang, Cynader, 2001) кондиционируют культуральную среду, секретируя пируват, который выполняет функцию антиоксиданта, удаляя  $H_2O_2$  из среды. Поэтому на первом этапе данной работы нашей задачей было оценить возможный вклад пирувата в систему защиты клеток линии CTLL-2 от окислительного стресса, чтобы впоследствии выявить эффекты, связанные с действием АПФ. Прежде всего мы провели серию экспериментов по изучению предполагаемого совокупного влияния АПФ и пирувата на выживание клеток CTLL-2 в условиях окислительного стресса. Для этого клетки культивировали в течение 3 ч в присутствии  $H_2O_2$  в различных концентрациях с добавлением 50 % КС клеток линии CTLL-2 или в свежей среде (контроль). По истечении этого срока определяли выживание клеток с использованием МТТ-теста. КС, содержащую АПФ и пируват, получали из культур высокой плотности клеток CTLL-2. Добавление 50 % КС к клеткам CTLL-2 значительно повышало их выживание при  $H_2O_2$  в высоких концентрациях (100—150 мКМ) (рис. 1). Причиной такого значительного повышения выживания клеток при высоких дозах  $H_2O_2$  может служить увеличение скорости его инактивации в среде в присутствии пирувата и АПФ.

В следующей серии экспериментов мы исследовали кинетику удаления внесенного  $H_2O_2$  из клеточных культур, содержащих клетки CTLL-2 в свежей среде или 50 % КС. В культуры клеток вносили по 100 мКМ  $H_2O_2$  и через различные интервалы времени определяли содержание  $H_2O_2$  в этих культурах. В культурах, в которых клетки CTLL-2 находились в свежей среде (рис. 2, а, кривая 1), наблюдалась типичная картина экспоненциального снижения концентрации  $H_2O_2$ , обусловленного функционированием ферментов глутатионпероксидазы и каталазы (Makino et al., 1994). В этом случае время полуудаления  $H_2O_2$  из среды ( $T_{1/2}$ ) составило около 30 мин. Внесение КС в культуру существенно изменяло кинетику удаления

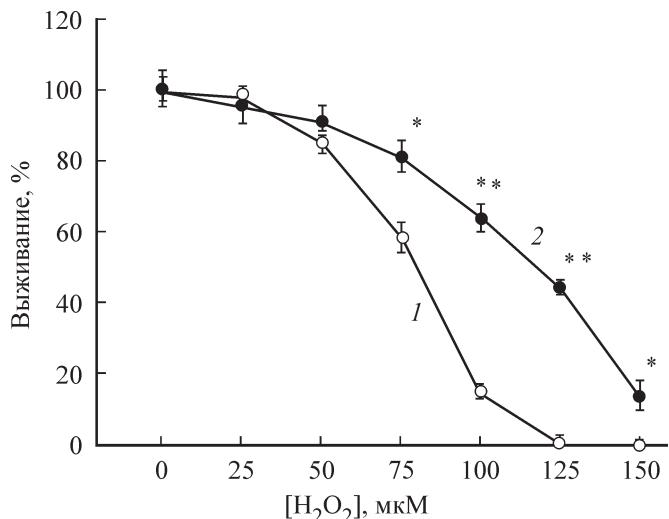


Рис. 1. Выживание клеток CTLL-2 в условиях окислительного стресса при их культивировании в свежей среде (1) или в среде, содержащей 50 % кондиционированной среды (КС, 2).

Клетки культивировали при различных начальных дозах  $H_2O_2$  в течение 3 ч; выживание клеток при различных концентрациях  $H_2O_2$  рассчитывали в % от их выживания в отсутствие  $H_2O_2$ ; плотность клеточных культур составляла  $2 \cdot 10^5$  кл./мл; различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.05$  (\*) или  $P < 0.001$  (\*\*).

$H_2O_2$  из культуральной среды. В присутствии КС наблюдали значительное увеличение скорости удаления  $H_2O_2$  из культур на начальном этапе культивирования, так что через 15 мин разница в концентрациях  $H_2O_2$  между опытом и контролем составила около 40 мКМ (рис. 2, а, кривые 1, 2). В этом случае время  $T_{1/2}$  оказалось менее 15 мин. При последующем культивировании кинетика удаления  $H_2O_2$  приобретала вид, характерный для контрольных культур.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что с 1-х мин культивирования клеток CTLL-2 в присутствии КС пируват, который входит в ее состав, вступает в реакцию с  $H_2O_2$  и удаляет его часть из среды. Известно, что реакция пирувата с  $H_2O_2$  протекает достаточно быстро, так что уже через 5 мин концентрации реагентов снижаются в 5—10 раз (O'Donnell-Tormey et al., 1987; Desagher et al., 1997). Поэтому можно предположить, что к 15-й мин большая часть пирувата уже прореагировала с  $H_2O_2$ . Для проверки этого предположения мы исследовали кинетику удаления  $H_2O_2$  из культур в результате его реакции с пируватом в отсутствие клеток. Для этого мы проводили инкубацию  $H_2O_2$  (100 мКМ) в течение различных интервалов времени с добавлением 50 и 75 мКМ пирувата в полной культуральной среде и определяли содержание  $H_2O_2$  через выбранные интервалы времени. Для проверки стабильности  $H_2O_2$  в культуральной среде в ряд лунок планшета вносили по 100 мКМ  $H_2O_2$  без добавления пирувата (контроль) и проверяли его содержание в этих лунках через те же интервалы времени, что и в опытных культурах. Как и ожидалось, уровень  $H_2O_2$  в присутствии пирувата снижался только в начале инкубации, после 15-й мин его концентрация в среде практически не изменялась (рис. 2, б). Сравнение данных, представленных на рис. 2, а, б, указывает на то, что падение уровня  $H_2O_2$  в начале культивирования при добавлении КС действительно обусловлено его реакцией с пируватом, присутствующим в КС. Кроме того, сравнение этих данных позволяет

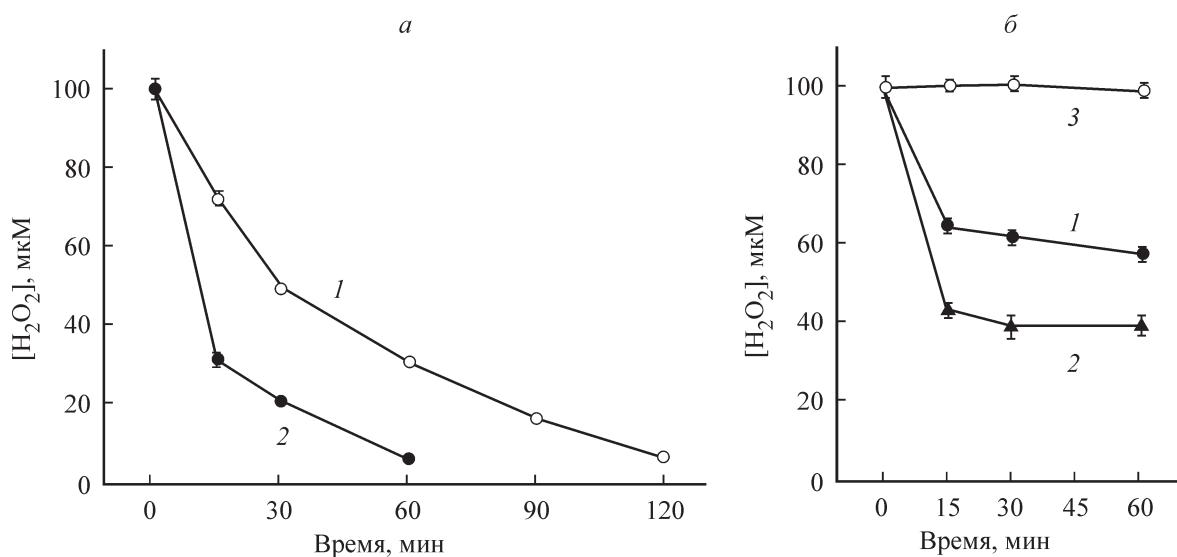


Рис. 2. Кинетика удаления из среды внесенного  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 мкМ) клетками CTL2-2 (а) или в отсутствие клеток в результате реакции с пируватом (б).

а — клетки инкубировали или в свежей среде (1) или с добавлением 50 % КС (2); плотность клеточных культур составляла  $2 \cdot 10^5$  кл./мл; б — в отсутствие клеток в лунки вносили среду с пируватом в концентрациях 50 (1) и 75 (2) мкМ или среду без пирувата (3, контроль).

грубо оценить концентрацию пирувата в КС как находящуюся в интервале от 100 до 150 мкМ.

Для того чтобы измерить концентрацию пирувата, содержащегося в КС клеток CTL2-2, культивируемых в течение 24 ч с начальной плотностью  $1 \cdot 10^6$  кл./мл, мы использовали метод, основанный на реакции превращения пирувата в лактат с регистрацией уровня NADH (O'Donnell-Tormey et al., 1987). Оказалось, что значение концентрации пирувата в образцах КС, получаемой при указанных выше условиях, составляет  $138 \pm 7$  мкМ ( $n = 15$ ), что неплохо согласуется с данными литературы (O'Donnell-Tormey et al., 1987). Присутствие пирувата в КС в таких значительных количествах может маскировать эффекты, обусловленные действием собственно АПФ, поэтому возникла необходимость его удаления из КС. Для удаления пирувата и первичного анализа физико-химических характеристик АПФ, входящих в КС, мы применили ультрафильтрацию КС путем центрифугирования (400 g) с использованием конических фильтров двух типов — CF50 и CF25 (Amicon, США). Эти фильтры пропускают только молекулы, имеющие мол. массу менее 50 и 25 кДа соответственно. В процессе ультрафильтрации КС через эти фильтры удалось получить вещества с мол. массами более 50 кДа (концентрат CF50) и менее 25 кДа (фильтрат CF25). Вещества с мол. массой 25—50 кДа не обнаруживались, фильтрат CF50 свободно проходил через фильтр CF25. Определение активности полученных фракций в teste выживания клеток CTL2-2 при окислительном стрессе показало, что добавление концентрата CF50 не оказывает достоверного эффекта на выживание клеток (рис. 3, кривая 2), в то время как добавление фильтрата CF25 приводит к значительному повышению их выживания (рис. 3, кривая 3). Полученные результаты указывают на то, что защитное действие КС на клетки CTL2-2 в условиях окислительного стресса связано с молекулами, обладающими мол. массами менее 25 кДа. Однако поскольку пируват также входит в фильтрат CF25, охарактеризовать собственную протективную активность АПФ, имеющих невысокие молекулярные массы, с использова-

нием ультрафильтрации КС через этот фильтр не представляется возможным.

Поэтому для дальнейшей очистки КС от пирувата мы после ультрафильтрации с использованием фильтра CF25 проводили ее гель-фильтрацию на колонке с использованием геля Bio-Gel P-10, для которого характерен диапазон разделения глобулярных белков от 1.5 до 20.0 кДа. Такой выбор носителя позволял решить сразу обе задачи, стоящие перед нами, — избавиться от пирувата и разделить

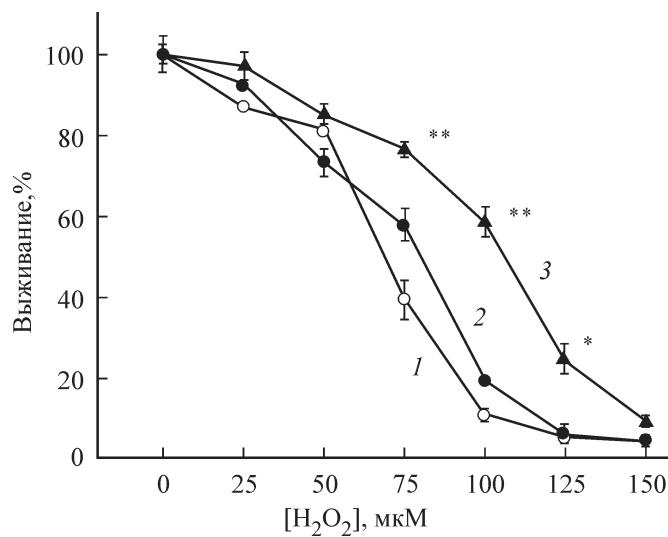


Рис. 3. Выживание клеток CTL2-2 в условиях окислительного стресса при их культивировании в свежей среде (1), с добавлением 50 % концентрата CF50 (2) или 50 % фильтрата CF25 (3).

Клетки культивировали при различных начальных дозах  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 3 ч; концентрат CF50 и фильтрат CF25 вносили по 5 % сыворотки; плотность клеточных культур составляла  $2 \cdot 10^5$  кл./мл; выживание клеток при различных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  рассчитывали в % от их выживания в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; различия между опытными и контрольными данными (кривые 3 и 1) достоверны при уровне значимости  $P < 0.005$  (\*) или  $P < 0.001$  (\*\*).

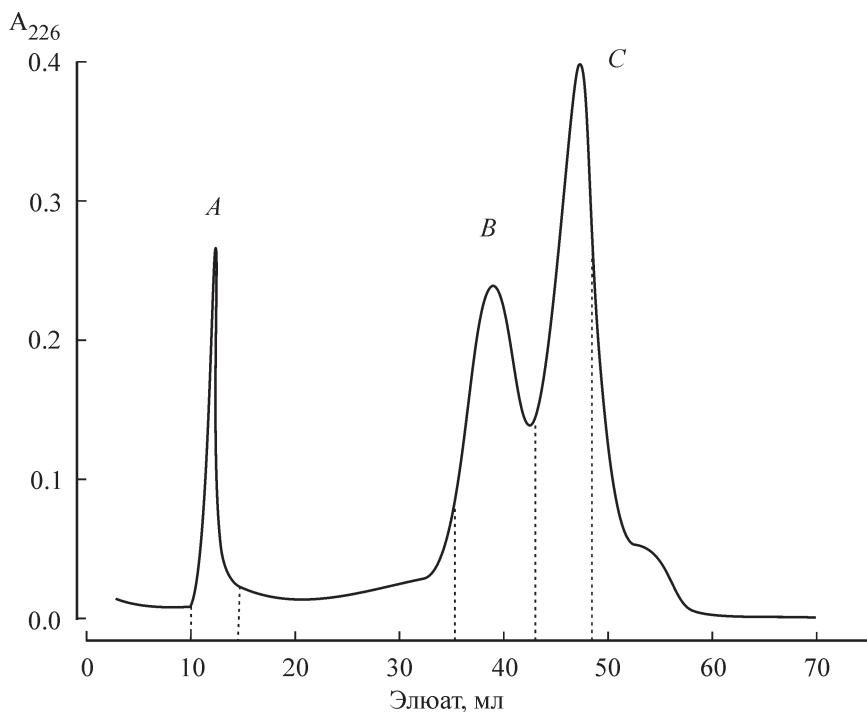


Рис. 4. Гель-фильтрация КС на колонке с гелем BioGel P-10 (0.8 × 75.0 см).  
По вертикали — абсорбция при 226 нм; элюцию проводили фосфатным буфером, pH 7.3.

протеины, секретируемые клетками CTLL-2 и содержащиеся в КС.

На хроматограмме, получаемой после гель-фильтрации КС, можно выделить три отдельных пика, соответствующих трем видам протеиновых молекул, которые были собраны в объединенные фракции A, B и C (рис. 4). Элюат, соответствующий четвертому пику хроматограммы

(50—60 мл), в опытах не использовали. Он содержал феноловый красный — pH-индикатор среды RPMI-1640 — и другие низкомолекулярные соединения. Фракция A выходила из колонки первой, она содержала самые крупные молекулы. Во всех используемых в опытах фракциях пируват не обнаруживался.

Для оценки влияния фракций, полученных в результате гель-фильтрации, на выживание клеток линии CTLL-2 в условиях окислительного стресса мы добавляли  $H_2O_2$  в различных концентрациях либо к культурам со свежей средой, либо к культурам с фракциями КС, содержащими различные АПФ. Клетки инкубировали в этих условиях в течение 3 ч с добавлением ИЛ-2 и сыворотки (до 5 %), а затем определяли их выживание с помощью MTT-теста. Оказалось, что самой высокой защитной способностью при окислительном стрессе клеток CTLL-2 обладают АПФ фракции B. Внесение в культуры фракции A, содержащей молекулы АПФ с наибольшей молекулярной массой, также приводило к достоверному повышению выживания клеток при стрессе, в то время как содержимое фракции C не оказывало влияния на выживание клеток (рис. 5).

В настоящее время хорошо известно, что причиной гибели клеток при окислительном стрессе является истощение внутриклеточного АТФ (Spragg et al., 1985; Hyslop et al., 1988). Поэтому для выяснения механизма защитного действия АПФ на клетки CTLL-2 в условиях окислительного стресса мы в первую очередь исследовали их влияние на энергетический метаболизм клеток в этих условиях. Действие активных фракций A и B на энергетический метаболизм клеток в условиях окислительного стресса (100 мкМ  $H_2O_2$ ) оценивали по их влиянию на кинетику уровня внутриклеточного АТФ. Оказалось, что фракция A не оказывает влияния на содержание АТФ в клетках CTLL-2 в условиях окислительного стресса, в то

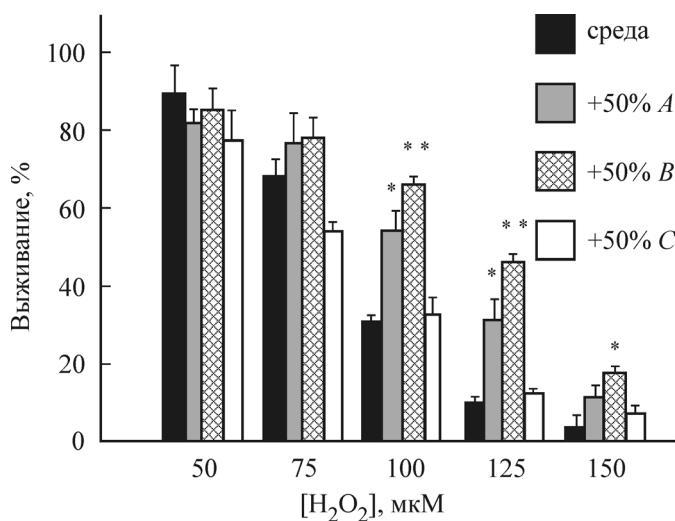


Рис. 5. Влияние фракций КС (A, B и C), полученных в результате гель-фильтрации, на выживание клеток CTLL-2 в условиях окислительного стресса.

Клетки культивировали при различных начальных дозах  $H_2O_2$  в течение 3 ч; во фракции A, B или C вносили по 5 % сыворотки; плотность клеточных культур составляла  $2 \cdot 10^5$  кл./мл; выживание клеток при различных концентрациях  $H_2O_2$  рассчитывали в % от их выживания в отсутствие  $H_2O_2$ ; различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.01$  (\*) или  $P < 0.001$  (\*\*).

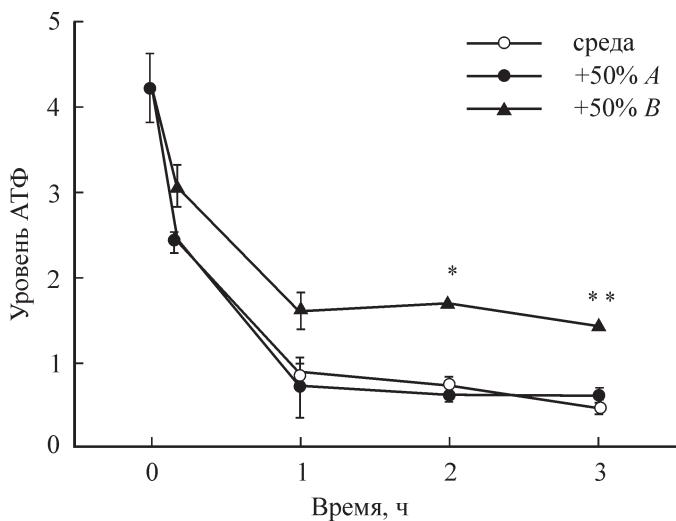


Рис. 6. Влияние фракций *A* и *B*, полученных в результате гель-фильтрации КС, на кинетику уровня АТФ в клетках CTLL-2 в условиях окислительного стресса.

Начальная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 мкМ; во фракции вносили по 5 % сыворотки; плотность клеточных культур составляла  $2 \cdot 10^5$  кл./мл; уровень АТФ дан в нмоль на  $10^6$  клеток; различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.05$  (\*) или  $P < 0.01$  (\*\*).

время как внесение фракции *B* в культуру приводило к сохранению внутриклеточного АТФ на всем протяжении эксперимента на достоверно более высоком уровне, чем в контроле (рис. 6). Эти данные могут свидетельствовать либо о наличии стимулирующего влияния АПФ из фракции *B* на энергетический метаболизм клеток, частично компенсирующего действие  $\text{H}_2\text{O}_2$ , либо об их участии непосредственно в процессе разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , либо о реализации обеих этих возможностей.

Для проверки способности молекул АПФ фракций *A* и *B* в отсутствие клеток реагировать с молекулами  $\text{H}_2\text{O}_2$  и их инактивировать фракции смешивали с  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 мкМ) и с течением времени определяли его содержание в лунках планшета. При внесении фракции *B* в лунки в них наблюдали значительное снижение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  уже через 30 мин (рис. 7, кривая 1), в то время как фракция *A* на содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  достоверно не влияла (рис. 7, кривая 2). Таким образом, молекулы АПФ, входящие во фракцию *B*, обладают способностью непосредственно реагировать с молекулами  $\text{H}_2\text{O}_2$  и инактивировать их в культуральной среде. В то же время нельзя полностью исключить и такую возможность, что на начальном этапе окислительного стресса, пока молекулы АПФ фракции *B* еще не прореагировали с молекулами  $\text{H}_2\text{O}_2$ , они способны оказывать стимулирующее влияние на энергетический метаболизм клеток CTLL-2, частично компенсируя ингибирующее действие  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Аутокринные полипептидные факторы, содержащиеся во фракции *A*, не влияют на энергетический метаболизм клеток CTLL-2 при окислительном стрессе (рис. 6) и практически не оказывают влияния на уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в культуре в отсутствие клеток (рис. 7). По-видимому, при окислительном стрессе протективное действие этих АПФ на клетки осуществляется по другим механизмам, и этот вопрос требует отдельного исследования.

Способность АПФ при окислительном стрессе клеток непосредственно реагировать с молекулами  $\text{H}_2\text{O}_2$  и инактивировать их в среде еще не описана в литературе. Вмес-

те с тем имеется много свидетельств способности клеток секретировать различные антиоксиданты во внеклеточную среду и тем самым ослаблять действие АФК на клетки при окислительном стрессе. Кроме пирувата, который секретируют многие опухолевые линии и нормальные клетки (O'Donnell-Tormey et al., 1987; Wang, Cynader, 2001), клетки некоторых лейкозных линий обладают способностью к аутокринной продукции экстраклеточной каталазы (Sandstrom, Buttke, 1993; Moran et al., 2002), а гепатоциты и клетки почечных канальцев способны секретировать в окружающую среду глутатионпероксидазу (Avissar et al., 1989; Whitin et al., 2002). Кроме того, трипептид глутатион, выступающий в качестве кофактора глутатионпероксидазы, некоторыми видами клеток также секретируется во внеклеточную среду. Так, глутатион в восстановленной форме секретируется клетками печени и поступает в желчь, где играет важную роль в инактивации реактивных соединений эндогенного и экзогенного происхождения (Jaeschke, Wendel, 1988; Ballatori, Rebeiro, 1998), а кроме того, высвобождается в плазму крови (Anderson, Meister, 1980; Ballatori, Rebeiro, 1998). Астроциты секретируют глутатион вместе с фактором, обладающим свойствами супероксиддисмутазы, что обеспечивает дополнительную защиту нервной ткани от окислительного стресса (Stewart et al., 2002). Секреция глутатиона во внеклеточную среду наблюдается также в эпителиальных клетках конъюнктивы глаза, причем его секреция в этих клетках идет преимущественно в апикальном направлении, обеспечивая защиту конъюнктивы от окислительного стресса в области ее контакта с кислородом воздуха (Gukasyan et al., 2002).

Таким образом, в настоящей работе получены данные, указывающие на существование аутокринных полипептидных факторов, секретируемых клетками цитотоксической ИЛ-2-зависимой линии CTLL-2 и способных наряду с пируватом реагировать с молекулами  $\text{H}_2\text{O}_2$  в околоклеточном пространстве и инактивировать их, что

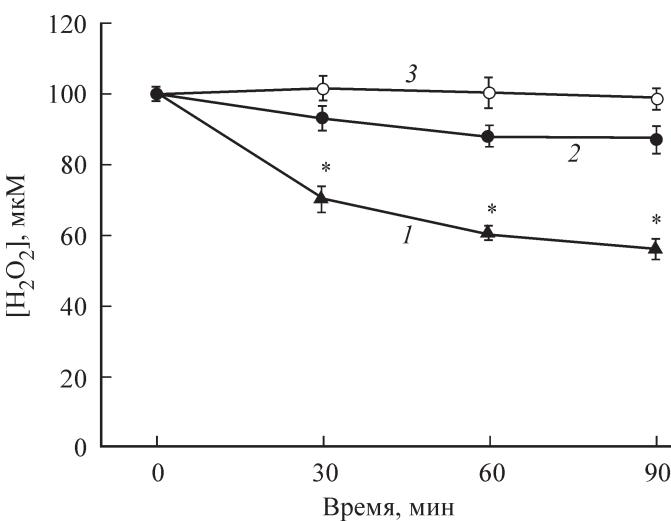


Рис. 7. Кинетика удаления из среды внесенного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в результате его реакции с молекулами АПФ фракций *A*, *B* в отсутствие клеток.

$\text{H}_2\text{O}_2$  в соотношении 1 : 1 смешивали с фракцией *B* (1), фракцией *A* (2) или со средой (3, контроль); во фракции вносили по 5 % сыворотки; начальная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  составляла 100 мкМ; инкубацию проводили при 37 °C. Различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.001$  (\*).

способствует выживанию клеток в условиях окислительного стресса. В то же время вопрос о физико-химических характеристиках этих факторов и их месте среди других антиоксидантов требует дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении данной работы Вильяму Тэлфорду (William Telford; Национальный институт здоровья — NIH, США).

Работа выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (проект 2627).

### Список литературы

- Луценко Г. В., Гречихина М. В., Дьячкова Л. Г. 2005. Регуляция уровня АТФ в нормальных и трансформированных Т-клетках аутокринными факторами. Иммунология. 26 (2) : 91—95.
- Луценко Г. В., Гречихина М. В., Дьячкова Л. Г., Луценко Н. И. 2007. Влияние дефицита аутокринных факторов в культуре на выживание и энергетический метаболизм клеток линии CTLL-2 в условиях окислительного стресса. Цитология. 49 (4) : 284—291.
- Луценко Г. В., Дьячкова Л. Г. 2003. Роль энергетического метаболизма клеток цитотоксической линии CTLL-2 в механизме контроля их выживания аутокринными факторами. Биол. мембрany. 20 (5) : 401—408.
- Луценко Г. В., Дьячкова Л. Г., Сапожников А. М. 2001. Контроль выживания клеток цитотоксической линии CTLL-2 аутокринными факторами. Роль плотности клеточных культур. Биол. мембрany. 18 (4) : 312—319.
- Пальцев М. А., Иванов А. А. 1995. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина. 224 с.
- Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовидко А. В., Алексеевский А. В., Алексеевский Д. А., Васильев Ю. М., Мерфи М. П., Черняк Б. В., Скулачев В. П. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84.
- Anderson M. E., Meister A. 1980. Dynamic state of glutathione in blood plasma. J. Biol. Chem. 255 : 9530—9536.
- Avissar N., Whitin J. C., Allen P. Z., Wagner D. D., Liegey P., Cohen H. J. 1989. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. J. Biol. Chem. 264 : 15 850—15 855.
- Ballatori N., Rebbeor J. F. 1998. Roles of MRP2 and oatp 1 in hepatocellular export of reduced glutathione. Semin. Liver Dis. 18 : 377—387.
- Denizot F., Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. J. Immunol. Meth. 82 : 271—277.
- Desagher S., Glowinski J., Premont J. 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. J. Neurosci. 17 : 9060—9067.
- Goka A. R., Farthing M. J. 1987. The use of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. J. Immunoassay. 8 : 29—41.
- Gukasyan H. J., Lee V. H. L., Kim K.-J., Kannan R. 2002. Net glutathione secretion across primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 : 1154—1161.
- Heldin C. H., Westmark B. 1990. Platelet-derived growth factor: mechanism of activation and possible *in vivo* function. Cell Regul. 1 : 555—566.
- Hyslop P. A., Hinshaw D. B., Halsey W. A., Schraufstatter I. U., Sauerheber R. D., Spragg R. G., Jackson J. H., Cochrane C. G. 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 263 : 1665—1675.
- Ishizaki Y., Burne J. F., Raff M. C. 1994. Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. J. Cell Biol. 126 : 1069—1077.
- Ishizaki Y., Voyvodic J. T., Burne J. F., Raff M. C. 1993. Control of lens epithelial cell survival. J. Cell Biol. 121 : 899—908.
- Jaeschke H., Wendel A. 1988. Choleresis and increased biliary efflux of glutathione induced by phenolic antioxidants in rats. Toxicology. 52 : 225—235.
- Makino N., Mochizuki Y., Bannai S., Sugita Y. 1994. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. J. Biol. Chem. 269 : 1020—1025.
- Moran E. C., Kamiguti A. S., Cawley J. C., Pettitt A. R. 2002. Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. Brit. J. Haematol. 116 : 316—328.
- Nathan C. F., Arrick B. A., Muray H. W., De Santis N. M., Cohn Z. A. 1980. Tumor cell anti-oxidant defenses. Inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytosis. J. Exp. Med. 153 : 766—782.
- Nowak D. 1990. Hydrogen peroxide release from human polymorphonuclear leukocytes measured with horseradish peroxidase and o-dianisidine. Biomed. biochim. acta. 49 : 353—362.
- O'Donnell-Tormey J., DeBoer C. J., Nathan C. F. 1985. Resistance of human tumor cells *in vitro* to oxidative cytosis. J. Clin. Invest. 76 : 80—86.
- O'Donnell-Tormey J., Nathan C. F., Lanks K., DeBoer C. J., De La Harpe J. 1987. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. J. Exp. Med. 165 : 500—514.
- Ohmori H. 1988. Development of a serum-free medium for *in vitro* immune responses by using  $\beta$ -cyclodextrin. J. Immunol. Meth. 112 : 227—233.
- Sandstrom P. A., Buttke T. M. 1993. Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 4708—4712.
- Spragg R. G., Hinshaw D. B., Hyslop P. A., Schraufstatter I. U., Cochrane C. G. 1985. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D<sub>1</sub> cells after oxidant injury. J. Clin. Invest. 76 : 1471—1476.
- Stewart V. C., Stone R., Gegg M. E., Sharpe M. A., Hurst R. D., Clark J. B., Heales S. J. 2002. Preservation of extracellular glutathione by an astrocytes derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. J. Neurochem. 83 : 984—991.
- Tumber A., Meikle M. C., Hill P. A. 2000. Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. J. Endocrinol. 167 : 383—390.
- Wang X. F., Cynader M. S. 2001. Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. J. Neurosci. 21 : 3322—3331.
- Whitin J. C., Bhamre S., Tham D. M., Cohen H. J. 2002. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 293 : F20—F28.

AUTOCRINE FACTOR PARTICIPATION IN DEFENCE OF CYTOTOXIC CTLL-2 CELLS  
FROM OXIDATIVE STRESS

*G. V. Lutsenko, M. V. Grechikhina, L. G. Diachkova*

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;  
e-mail: gvlut@mail.ibch.ru

The role of autocrine factors (AF) secreted by cytotoxic IL-2-dependent CTLL-2 cells along with pyruvate in cell defense from oxidative stress was investigated. The addition of conditioned medium (CM) containing pyruvate and AF into CTLL-2 cell cultures increased significantly cell survival under oxidative stress condition. The kinetics of hydrogen peroxide removal from cell cultures under oxidative stress in the case of CM addition has been obtained. The removal of  $H_2O_2$  mostly by means of its reaction with pyruvate that is contained in CM has been shown at the beginning of oxidative stress (up to 15 min). Pyruvate content in CM was determined as  $138 \pm 7 \mu\text{M}$ . Cell filtration on column with Bio-Gel P-10 was used for removal pyruvate from CM. Three fractions of CM (*A*, *B* and *C*) were obtained as a result of gel filtration. Pyruvate was not detected in any fraction. The fraction *A* was eluted from column as the first one and contained the largest molecules. Cell survival test showed the fraction *B* to have the highest ability to protect CTLL-2 cells under oxidative stress. The fraction *A* supported cell survival to a less degree and fraction *C* was shown to have no protective ability. The addition of the fraction *B* to the cell cultures resulted in preservation of significantly higher intracellular ATP level in the cells under oxidative stress than in the control ones. Moreover, AF of the fraction *B* was shown to react directly with hydrogen peroxide and inactivate it in the absence of cells. AF of the fraction *A* did not have such properties.

**Key words:** oxidative stress, hydrogen peroxide, autocrine factors, pyruvate, cell survival, ATP, antioxidants.