

## МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА В МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ПОЛИМОРФИЗМА С-262Т ГЕНА КАТАЛАЗЫ

*© A. B. Комина,<sup>1</sup> Т. Г. Рукиша*

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого;  
\* электронный адрес: komivlann@yandex.ru*

Каталаза — ключевой фермент, определяющий метаболизм пероксида водорода в условиях окислительного стресса. Известно, что полиморфизм С-262Т гена каталазы связан с повышенным риском развития ряда заболеваний. В данной работе была оценена жизнеспособность в условиях окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов, выделенных у лиц с различными вариантами полиморфизма С-262Т гена каталазы (CC, CT и TT). Определено, что клетки с вариантом генотипа TT имеют меньшую жизнеспособность в присутствии пероксида водорода в концентрации 1000 мкмоль/л по сравнению с вариантами CC и CT. При этом в отличие от вариантов генотипа CC и CT в случае генотипа TT не происходит активации митохондриального пути апоптоза даже при концентрации пероксида водорода 1 мМ. Полученные данные могут объяснить повышенный риск развития заболеваний, связанных с работой антиоксидантной защиты у носителей двух мутантных аллелей.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, пероксид водорода, апоптоз, TSPO.

**Принятые сокращения:** TSPO — белок-транслокатор периферического бензодиазепинового рецептора (translocator protein), CAT — каталаза.

В процессе биологического окисления субстрата молекулярным кислородом в живой клетке образуются промежуточные соединения, обладающие химической активностью, — активные формы кислорода. В норме они выполняют в клетке важные защитные и регуляторные функции, однако в силу своей агрессивности могут выступать в качестве повреждающего фактора. Одним из таких соединений является пероксид водорода.

Пероксид водорода рассматривается как важная сигнальная молекула в клетке. Он участвует в возникновении и передаче сигналов посредством окисления цистeinовых остатков некоторых белковых рецепторов, таких как протеинтиозинфосфатазы (Reth, 2002; Ree et al., 2003), а также в окислении ряда белков, вызывая их пространственную модификацию и, следовательно, возможное изменение их функциональной активности (Reth, 2002). С участием пероксида водорода связывают такие процессы в клетке, как пролиферация и апоптоз, а также реализацию защиты от чужеродных агентов в организме (Чеснокова и др., 2006а). Среди других активных форм кислорода пероксид водорода выделяется не высокой реaktivностью, но стабильностью молекулы и способностью при определенных условиях дать начало другому, гораздо более агрессивному соединению — гидроксильному радикалу. Кроме того, повышенное содержание этого соединения может привести к изменениям в регуляции таких процессов, как клеточная пролиферация, апоптоз и дифференцировка клеток. Поэтому поддержание его количества на физиологическом уровне является важным процессом.

Утилизация пероксида водорода осуществляется главным образом с участием ферментов глутатионперо-

ксидазы и каталазы, а также пероксидредоксина (Ree et al., 2003). Глутатионпероксидаза обнаруживается в цитоплазме и митохондриях, где она выполняет свою основную функцию, разрушая пероксид водорода при его низких концентрациях, тогда как каталаза локализуется и проявляет активность в пероксисомах, микросомах и цитозоле клетки, являясь важнейшим ферментом регуляции уровня пероксида водорода при его повышенных концентрациях — в условиях окислительного стресса (Turrens, 2003; Чеснокова и др., 2006б).

Известно, что наличие точечной мутации С-262Т в промоторной части гена каталазы приводит к изменению как уровня экспрессии данного гена, так и активности самого белка (Forsberg et al., 2001). Согласно результатам многочисленных исследований, данный полиморфизм встречается во всех человеческих популяциях, различаясь лишь частотой мутантного аллеля. Результаты проведенных исследований позволяют связывать наличие мутантного аллеля в данном положении с повышенением риска развития таких заболеваний, как артериальная гипертензия, индуцируемый мышьяком гиперкератоз, эластическая псевдоксантома (Zarbock et al., 2007), и даже с изменением продолжительности жизни (Паук и др., 2008).

Таким образом, можно предположить, что изменения в работе каталазы при наличии мутации С-262Т приводят к существенным изменениям в работе всей системы, связанной с данным ферментом, и к изменению резистентности клеток к окислительному стрессу, вызванному пероксидом водорода.

Окислительный стресс — состояние клетки, при котором запускаются резервные механизмы защиты, и био-

логическое поведение клетки может изменяться как в сторону выживания, так и в сторону гибели. В последнем случае в клетке запускается процесс апоптоза. Апоптоз — сложный многоступенчатый процесс, инициация которого может осуществляться с участием различных сигнальных путей. Основными путями передачи сигнала в цитоплазму клетки считаются рецептор-зависимый путь, идущий от поверхности клеточной мембранны, и митохондриальный путь — из межмембранного митохондриального пространства. В последнее время апоптоз, опосредованный присутствием активных форм кислорода, связывают именно с митохондриальным сигнальным путем развития, в реализации которого принимают участие ряд митохондриальных белков, в том числе, белок-транслокатор (translocator protein, TSPO) (Casellas et al., 2002), известный также как периферический бензодиазепиновый рецептор (peripheral benzodiazepine receptor, PBR). Этот белок является компонентом мембранный митохондриальной поры и принимает участие в регуляции ее работы, способствуя изменению мембранныго потенциала и высвобождению цитохрома *c* (Kroemer, Reed, 2000). Таким образом, TSPO расценивается как маркерный белок митохондриального сигнального пути апоптоза. Кроме того, в случае присутствия активных форм кислорода он обнаруживается в комплексе с более крупными молекулами (Corsi et al., 2008).

В этой связи представляет интерес определение уровня TSPO как маркера клеточного ответа на присутствие пероксида водорода в клетках с различными вариантами полиморфизма C-262T в гене каталазы в условиях окислительного стресса.

Целью данной работы явилось изучение возможной взаимосвязи между наличием полиморфизма гена каталазы C-262T и способностью клетки реагировать на окислительный стресс, индуцированный пероксидом водорода.

## Материал и методика

Для исследования использовали мононуклеарные лейкоциты периферической крови добровольных доноров с различными вариантами полиморфизма C-262T в гене *CAT* — CC, CT и TT, подтвержденными методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализа). Возраст доноров составил 29—31 год.

Лейкоциты выделяли из периферической крови путем градиентного центрифугирования с раствором Фиккол-1077 Диаколл (Диа-М, Россия), после чего промывали физиологическим раствором, супензировали в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином с добавлением бычьей фетальной сыворотки (10 %), пенициллина (100 Ед/мл) и амфотерицина В (0.25 мкг/мл) и доводили до концентрации  $2 \cdot 10^6$  кл./мл. Затем клетки рассеивали в планшет для культивирования и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ).

Для моделирования окислительного стресса через 24 ч после начала культивирования в культуре добавляли раствор пероксида водорода в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином и бычьей фетальной сывороткой. Конечные концентрации пероксида водорода составляли 400, 700 и 1000 мкМ.

Через 24 ч после добавления пероксида водорода производили оценку выраженности апоптоза методом прямого подсчета клеток под люминесцентным микро-

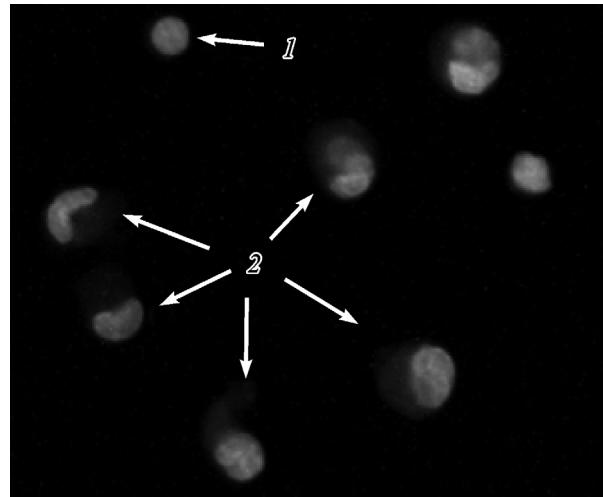


Рис. 1. Мононуклеарные лейкоциты через 24 ч после добавления пероксида водорода в культуральную среду.

Окраска акридиновым оранжевым/бромистым этидием. Живая клетка (1) при окраске имеет округлую форму, ровный четкий контур и относительно равномерную окраску. Апоптотические клетки (2) отличаются конденсированным содержимым, приобретают неправильную форму, контур клетки становится размытым за счет выпячиваний цитоплазматической мембранны. Об. 40×.

скопом Микромед 3 ЛЮМ (Микромед, Россия) после окраски акридиновым оранжевым/бромистым этидием (AO/EB; по 12 мкг/мл каждого) (Gerbu Biothechnick GmbH, MP Biomedicals Inc.) согласно методу Риблла и соавторов (Ribble et al., 2005). При этом живые клетки имели ровную округлую форму, крупное ядро и полностью окрашивались в зеленый цвет. Апоптотические клетки имели неправильную форму за счет выпячиваний цитоплазмы, которая окрашивалась слабо. Ядра апоптотических клеток были конденсированными, имели неправильную форму, а также частично или полностью окрашивались в зеленый или оранжевый цвет (рис. 1). Некротические клетки имели выраженную красно-оранжевую окраску.

Для оценки вклада митохондриального сигнального пути апоптоза определяли уровень белка TSPO в клетках, для чего осуществляли выделение мРНК из клеточных культур методом гуанидин-фенол-хлороформной экстракции с использованием комплекта реагентов Рибо-золь-В (Amplisens, Россия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора Реверта (Amplisens, Россия). Полученную кДНК использовали для постановки реакции ПЦР в реальном времени с применением специфических праймеров к TSPO (Taq-Man®Assay, Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля использовали β-актин (Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control; Applied Biosystems, США). ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Исходя из полученных значений порогового цикла Ct рассчитывали относительное количество TSPO в клетках (RQ).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Statistica 6.1. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Крускала—Уоллиса. Различия считались достоверными при  $P < 0.05$ . Данные представлены в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей.

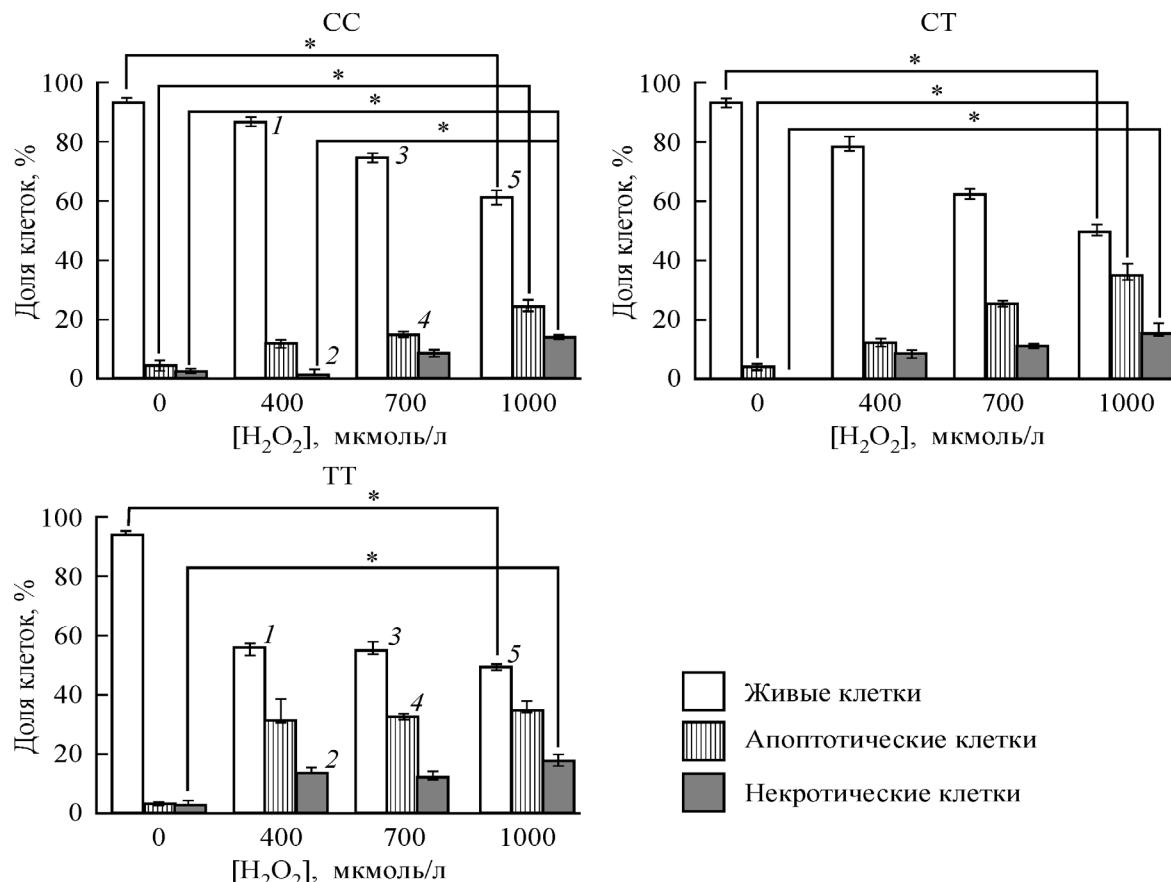


Рис 2. Сравнительное распределение долей живых, апоптотических и некротических мононуклеарных лейкоцитов с различными вариантами полиморфизма C-262T гена каталазы в зависимости от концентрации пероксида водорода в культуральной среде (представлены медианные значения, верхний и нижний квартили).

Звездочкой обозначены достоверные различия между процентным содержанием клеток одного варианта генотипа C-262T при различных концентрациях пероксида водорода (при множественном сравнении по Н-критерию Крускала—Уоллиса,  $P < 0.05$ ). Цифрами 1—5 обозначены достоверные различия между генотипами CC и TT при равных концентрациях пероксида водорода (при множественном сравнении по Н-критерию Крускала—Уоллиса, при  $P < 0.05$ ).

**Использованные реагенты.** В работе были использованы следующие реагенты: питательная среда RPMI-1640 с L-глутамином (Биолот, Россия), 3%-ный раствор пероксида водорода (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия), комплекты реагентов Рибо-золь-В, Реверта (Amplisens, Россия), специфические праймеры TaqMan®Assay, Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control (Applied Biosystems, США), акридиновый оранжевый (MP Biomedicals, Германия), бромистый этидий (GERBU Biotechnik GmbH, Германия).

## Результаты

При увеличении концентрации пероксида водорода в среде наблюдалась тенденция к постепенному снижению количества живых клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов с генотипом CC ( $P = 0.003$ ). При 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$   $H_2O_2$  доля живых клеток снизилась с 93.8 до 61.6 % ( $P = 0.002$ ). Параллельно росло число апоптотических клеток, достигнув 24.7 % при 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$   $H_2O_2$  ( $P = 0.003$ ). В культуре клеток с генотипом CT доля живых клеток при концентрации пероксида водорода 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$  снизилась с 95.2 до 50.9 % ( $P = 0.013$ ), а доля апоптотических клеток выросла с 4.0 до 35.3 %

( $P = 0.013$ ). В случае гомозиготного варианта генотипа TT доля живых клеток при 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$   $H_2O_2$  составила 49.2 % ( $P = 0.013$ ), однако при этом было показано увеличение числа не апоптотических, а некротических клеток (17.3 %;  $P = 0.019$ ). Гистограммы медианных значений процентного содержания живых, апоптотических и некротических клеток с верхними и нижними квартилями представлены на рис. 2.

При сравнении культур с различными вариантами полиморфизма C-262T при равных концентрациях пероксида водорода было выявлено различие в количестве живых и некротических клеток между вариантами генотипа CC и TT при 400  $\mu\text{моль}/\text{л}$  пероксида водорода ( $P = 0.015$ ). При 700  $\mu\text{моль}/\text{л}$  различия между CC и TT вариантами наблюдались для количества живых и апоптотических клеток ( $P = 0.015$ ). При самой высокой концентрации  $H_2O_2$  — 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$  — различия были выявлены только для количества живых клеток. Между генотипами CC и CT при множественном сравнении по критерию Крускала—Уоллиса статистически значимых различий выявлено не было.

Во всех образцах наблюдалось статистически значимое увеличение числа некротических клеток в пробах с 1000  $\mu\text{моль}/\text{л}$   $H_2O_2$  ( $P_{CC} = 0.018$ ,  $P_{CT} = 0.013$ ,  $P_{TT} = 0.013$ ).

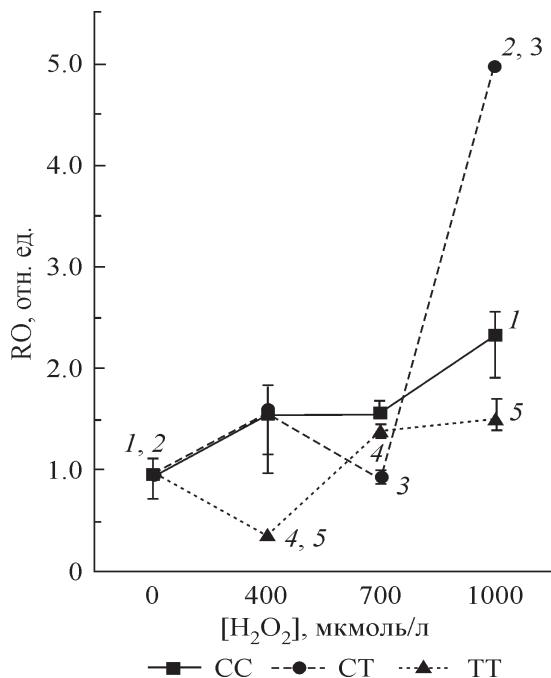


Рис. 3. Количество (RQ) мРНК TSPO по отношению к  $\beta$ -актину в мононуклеарных лейкоцитах с различными вариантами полиморфизма C-262T гена каталазы в зависимости от концентрации пероксида водорода в культуральной среде (представлены медианные значения и верхний и нижний квартили).

Достоверные различия RQ между различными концентрациями  $H_2O_2$  для одного полиморфизма (при множественном сравнении по Н-критерию Крускала—Уоллиса): 1 — между 0 и 1000 мкМ для варианта CC, 2 — то же для варианта CT, 3 — между 700 и 1000 мкМ для варианта CT, 4 — между 400 и 700 мкМ для варианта TT, 5 — между 400 и 1000 мкМ для варианта TT.

При определении уровня TSPO в клетках мы также наблюдали достоверное увеличение относительного количества мРНК данного белка в клетках с генотипами CC и CT в присутствии  $H_2O_2$  в концентрации 1000 мкмоль/л. При этом если в случае генотипа CC уровень экспрессии вырос в 2.4 раза ( $P = 0.018$ ) относительно контроля, то в случае генотипа CT — в 5 раз ( $P = 0.012$ ). В культуре клеток с генотипом TT увеличения относительного количества TSPO не наблюдалось, при минимальной концентрации пероксида водорода в эксперименте — 400 мкмоль/л — было отмечено снижение уровня TSPO относительно его уровня при концентрациях 700 ( $P = 0.045$ ) и 1000 ( $P = 0.007$ ) мкмоль/л (рис. 3).

При сравнении клеток с разными генотипами, которые культивировались в среде с одинаковыми концентрациями пероксида водорода, были отмечены статистически значимые различия уровня TSPO для генотипа TT по сравнению с таковыми генотипов CC и CT при концентрации пероксида водорода 400 мкмоль/л ( $P = 0.034$  и  $P = 0.041$  соответственно). При 700 мкмоль/л различия были показаны между вариантами CC и CT ( $P = 0.010$ ), а при 100 мкмоль/л уровень экспрессии TSPO в образце с генотипом CT был выше такового в клетках с генотипом TT ( $P = 0.005$ ).

## Обсуждение

Полученные результаты позволяют предположить, что наличие мутаций в одном аллеле гена каталазы — 262CT — не влечет за собой существенных изменений в

работе ферментов антиперекисной защиты, вследствие чего устойчивость клеток к окислительному стрессу не меняется. Однако при небольших концентрациях пероксида водорода мы отмечаем значимое снижение уровня экспрессии TSPO, тогда как дальнейшее увеличение концентрации стрессового агента дает противоположный эффект. В этом случае, возможно, имеет место дозозависимое влияние пероксида водорода на уровень TSPO. Данное явление также было описано при воздействии на клетки ультрафиолетового излучения (Савченко и др., 2010) и хлорида аммония (Caballero et al., 2013). Известно также, что АФК вызывают структурные изменения в TSPO, индуцируя его полимеризацию (Delavoie, 2003). В свою очередь изменение структуры белка может быть сопряжено с изменением его функциональной активности. Отсутствие взаимосвязи между уровнем TSPO и выживаемостью клеток для вариантов генотипа СТ и ТТ в диапазоне концентраций пероксида водорода 400—700 мкмоль/л дает возможность предположить наличие альтернативного, возможно рецепторного, пути апоптоза клеток. В этом случае подключение митохондриального сигнального пути апоптоза, вероятно, происходит лишь при достижении концентрации  $H_2O_2$  1 мМ. Полученные данные согласуются с результатами исследования Новицкого с соавторами (2008), показавшими увеличение числа клеток со сниженным мембранным потенциалом в культуре мононуклеарных лейкоцитов при индукции апоптоза пероксидом водорода в концентрации 1 мМ. В то же время наличие генотипа ТТ значительно снижает жизнеспособность клеток при концентрации пероксида водорода 1 ммоль/л по сравнению с вариантами CC и СТ. При этом снижение количества TSPO при 400 мкмоль/л также может говорить о дозозависимом ответе на окислительный стресс. В отличие от вариантов генотипа СС и СТ для генотипа ТТ не происходит активации митохондриального пути апоптоза даже при концентрации пероксида водорода 1 мМ, и программируемая клеточная гибель заменяется спонтанным разрушением клеток под действием большого количества токсичного вещества.

Таким образом, наличие гомозиготной мутации С-262T в гене каталазы может являться важным фактором устойчивости клеток к окислительному стрессу под действием пероксида водорода. Это может объяснить повышенный риск развития заболеваний, связанных с работой антиоксидантной защиты у носителей двух мутантных аллелей.

## Список литературы

- Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Часовских Н. Ю., Старикова Е. Г., Кайгородова Е. В., Стариков Ю. В., Жукова О. Б. 2008. Модуляция апоптозамононуклеаров в условиях окислительного стресса. Бюл. эксперим. биол. мед. 145 (3) : 251—254. (Novitsky V. V., Ryazantseva N. V., Chasovskih N. Yu., Starikova E. G., Kaygorodova E. V., Starikov Yu. V., Jukova O. B. 2008. Modulation of apoptosis of mononuclear cells under conditions of oxidative stress. Bull. Exp. Biol. Med. 2008. 145 (3) : 283—286.)

Паук В. В., Насибуллин Т. Р., Туктарова И. А., Зуева Л. П., Мустафина О. Е. 2008. Полиморфизм генов ферментов антиоксидантной защиты в связи с продолжительностью жизни. Успехи геронтол. 21 (4) : 593—595. (Pauk V. V., Nasibullin T. R., Tuktarov I. A., Zueva L. P., Mustafina O. E. 2008. Antioxidant gene polymorphism in connection with lifespan. Success of Gerontology. 21 (4) : 593—595.)

- Savchenko I. A., Ruksha T. G., Salmin V. V., Zykova L. D.* 2010. Результаты экспериментального изучения воздействия УФ-облучения на фоточувствительный белок кожи. Вестн. дерматол. венерол. 3 : 33—36. (*Savchenko I. A., Ruksha T. G., Salmin V. V., Zykova L. D.* 2010. Results of an experimental study of the UV radiation effect on the photosensitive skin protein. J. Dermatol. Venereol. 3 : 33—36.)
- Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н.* 2006а. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы. Современные научные технологии. 6 : 28—34. (*Chesnokova N. P., Ponukalina E. V., Bizenkova M. N.* 2006. The sources of free radicals formation and their significance in biological systems in normal environment. Modern High Technologies. 6 : 28—34.)
- Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н.* 2006б. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. Успехи соврем. естествознания. 7 : 28—36. (*Chesnokova N. P., Ponukalina E. V., Bizenkova M. N.* 2006. Molecular-cellular mechanisms of free radical inactivation in biological systems. Success of Modern Natural Science. 7 : 28—36.)
- Caballero B., Veenman L., Bode J., Leschner S., Gavish M.* 2013. Concentration-dependent bimodal effect of specific 18 kDa translocator protein (TSPO) ligands on cell death processes induced by ammonium chloride. Potential implications for neuropathological effects due to hyperammonemia. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. DOI: 10.2174/18715273113126660194.
- Casellas P., Galiegue S., Basile A. S.* 2002. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. Neurochem. Int. 40 : 475—486.
- Corsi L., Geminiani E., Baraldi M.* 2008. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. Current Clin. Pharmacol. 3 : 38—45.
- Delavoie F., Li H., Hardwick M., Robert J. C., Giatzakis C., Peranzi G., Yao Z. X., Maccario J., Lacapère J. J., Papadopoulos V.* 2003. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. Biochemistry. 42 : 4506—4519.
- Forsberg L., Lyrens L., de Faire U., Morgenstern R.* 2001. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. Free Rad. Biol. Med. 30 : 500—505.
- Kroemer G., Reed J. C.* 2000. Mitochondrial control of cell death. Nature Med. 6 : 513—519.
- Ree S. G., Chang T.-Sh., Bae Y. S., Lee S.-R., Kang W. K.* 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. J. Amer. Soc. Neurrol. 14 : 211—215.
- Reth M.* 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. Nature Immunol. 3 : 1129—1134.
- Ribble D., Goldstein N. B., Norris D. A., Shellman Y. G.* 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. BMC Biotechnol. 5 : 12.
- Turrens J. F.* 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 522 (2) : 335—344.
- Zarbock R., Hendig D., Szliska C., Kleesiek K., Gotting C.* 2007 Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. Clin. Chem. 53 : 1734—1740.

Поступила 18 II 2014

## MODULATION OF APOPTOSIS IN MONONUCLEAR CELLS WITH DIFFERENT VARIANTS OF POLYMORPHISM C-262T IN CATALASE GENE

*A. V. Komina,<sup>1</sup> T. G. Ruksha*

Krasnoyarsk State Medical University;  
\* e-mail: komivlann@yandex.ru

Catalase is a key enzyme metabolizing hydrogen peroxide under conditions of oxidative stress. It is known that the C-262T polymorphism in catalase gene is implicated in higher risk of some diseases onset. In this article we have evaluated the viability of mononuclear leukocytes isolated from patients with different variants of C-262T polymorphism in catalase gene (CC, CT, TT) under conditions of hydrogen peroxide induced oxidative stress. It has been revealed that cells with TT variant of polymorphism have lower viability in the presence of hydrogen peroxide in a concentration of 1000 μM/L in comparison with cells having CC and CT genotypes. Furthermore, unlike CC and CT variants, cells with TT polymorphism showed no activation of mitochondrial apoptotic pathway even with hydrogen peroxide at a concentration of 1 mM. The data obtained may explain the increased risk of diseases related with the activity of the antioxidant system in patients with 262 TT promoter polymorphism in catalase gene.

**Key words:** oxidative stress, hydrogen peroxide, apoptosis, TSPO.