

УДК 577.352:577.152.34

Е. И. БЕЛЕВИЧ, Д. Г. КОСТИН, Е. И. СЛОБОЖАНИНА

**АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: Catherina_Bel_@tut.by

(Поступила в редакцию 18.12.2014)

Введение. В последнее десятилетие в качестве основного механизма, запускающего запрограммированную гибель эритроцитов (эриптоз), рассматривается повышение концентрации свободных ионов кальция в клетке [1–4]. Однако существует ряд других механизмов и процессов в клетке, которые участвуют в запуске процесса эриптоза [5–8]. Так, установлено участие в этом процессе церамида [6], истощения эритроцитов по АТФ [7] и активации каспаз [8]. Вопрос об участии каспаз в процессе эриптоза до сих пор остается спорным. Показана роль каспазы-3 в развитии эриптоза при таких заболеваниях, как диабет второго типа [9] и почечная недостаточность [10]. Обнаружена активность каспазы-3 и каспазы-8 в аннексин-V-положительных эритроцитах, выделенных из общей популяции эритроцитов крови [11]. В то же время авторы работы [9] хотя и зарегистрировали активность каспазы-3 в эритроцитах пациентов, страдающих диабетом второго типа, но подвергают сомнению значимость каспазы-3 для развития эриптоза из-за значительно более низкого содержания этого фермента в эритроцитах по сравнению с ядерными клетками. Основываясь на отсутствии активации прокаспаз при воздействии на эритроциты проапоптотических стимулов, другие авторы [12, 13] делают вывод, что эриптоз является «каспаза-независимым» процессом.

Каспаза-3 относится к семейству цистеиновых аспаргат-зависимых протеаз. На данный момент идентифицировано 12 каспаз человека, играющих важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспаления. Выделяют два типа каспаз, участвующих в апоптозе ядерных клеток: иницирующие (каспазы 2, 8, 9, 10) и эффекторные (каспазы 3, 6, 7) [14]. Иницирующие каспазы расщепляют неактивные эффекторные прокаспазы, таким образом активируя их. Активированные эффекторные каспазы в свою очередь расщепляют другие белки в клетке, запуская процесс апоптоза. Каспаза-3 существует в клетке в форме прокаспазы-3 с молекулярным весом 32 кДа, а активированная каспаза-3 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярным весом 17 и 12 кДа соответственно [15]. В эритроцитах активная каспаза-3 участвует в расщеплении спектрина, актина [15] и белка полосы 3 в N-терминальном цитоплазматическом домене, что приводит к образованию его димеров и экспонированию SCA (senescent cell antigen), а также к нарушению состояния основных структурных элементов эритроцита и выполняемых им функций [9]. Известно, что течение ряда заболеваний, например диабета второго типа [16] и сердечной недостаточности [17], сопровождается окислительным стрессом и повышенным эриптозом. При диабете второго типа наряду с окислительным стрессом происходит активация каспазы-3 в эритроцитах [9]. В процессе своей жизнедеятельности эритроциты также постоянно подвергаются окислительному стрессу, что, несмотря на мощную систему антиоксидантной защиты, вносит существенный вклад в их старение. Происходит ли активация каспаз при старении эритроцитов, пока не выяснено. В связи с этим является важным изучение активности каспазы-3 как в «старых» эритроцитах, так и в «молодых» эритроцитах, подвергшихся окислительному стрессу. Известно, что разви-

тию эриптоза предшествует снижение жизнеспособности клеток [18], а общепринятым качественным показателем эриптоза является перераспределение фосфатидилсерина (ФС) из внутреннего во внешний слой плазматической мембраны [1]. По нашему мнению, необходима комплексная оценка факторов, задействованных в эриптозе как при его моделировании, так и при патологии.

Цель работы – выяснить, активируется ли каспаза-3 во фракции «молодых» эритроцитов, подвергшихся окислительному стрессу (модель эриптоза), и во фракции «старых» клеток, а также определить параллельно другие предшественники и маркеры эриптоза – жизнеспособность и степень экспонирования фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали кровь здоровых доноров (консервант гепарин), полученную из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ. Эритроциты получали из крови путем центрифугирования и трижды отмывали в 155 мМ NaCl (4 °С, 3000 об/мин). В работе использованы фракции «молодых» и «старых» эритроцитов, разделение которых проводили в градиенте плотности Перколл-БСА согласно [19] на центрифуге Himac CE 60W (20 °С, 22 000 g_{av} , 20 мин). В отдельные пробирки отбирали фракцию клеток, соответствующую слою 68 % Перколла – «молодые» эритроциты и 80–84 % Перколла – «старые» клетки. Измерение активности каспазы-3 в эритроцитах проводили с помощью набора реагентов CaspGlow™ (BioVision Incorporated, США). Для определения жизнеспособности клеток использовали флуоресцентный реагент кальцеин АМ (Sigma, США). Перераспределение эндогенного ФС на внешнюю поверхность мембраны эритроцитов определяли по интенсивности флуоресценции FITC-меченного аннексин-V (BD Biosciences, США). Окислительный стресс в эритроцитах вызывали инкубацией суспензии клеток (2 %-ный гематокрит) с 2 мМ трет-бутилгидроперекиси (t-BHP) в буфере с pH 7,4, содержащем 10 мМ HEPES, 45 мМ NaCl, 90 мМ KCl и 44 мМ сахарозы, при 37 °С в течение 15 мин.

Флуоресцентные измерения выполнены с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критериев Манна–Уитни и Уилкоксона в программе STATISTICA 6.0. В работе представлены средние значения 5–6 независимых экспериментов. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Активность каспазы-3.* Для определения активности каспазы-3 в клетках используется ряд коммерческих наборов, которые основаны на фотоколориметрическом [7] или флуориметрическом [6] принципах анализа. Однако многие из них предполагают использование клеточных лизатов, что усредняет получаемые значения и не позволяет выделить клетки с более высокой или более низкой активностью каспазы-3. В то же время существуют наборы, позволяющие определять активность каспазы-3 в целых живых клетках [8]. Для оценки активности каспазы-3 нами был использован набор CaspGlow™, содержащий специфический свободнопроникающий в клетку флуорогенный FITC-меченный субстрат DEVD-fmk – (Asp-Glu-Val-Asp-fmk), который является ингибитором каспазы-3. При расщеплении флуорогенного субстрата FITC-DEVD-fmk каспазой-3 происходит увеличение интенсивности флуоресценции анализируемого образца.

Показано, что при окислительном стрессе, вызванном воздействием 2 мМ t-BHP в течение 15 мин при 37 °С на фракцию «молодых» эритроцитов, происходит увеличение интенсивности флуоресценции расщепленного субстрата

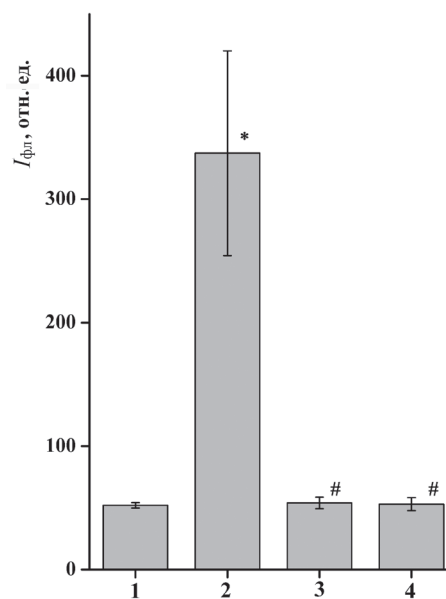


Рис. 1. Активность каспазы-3 ($I_{фл}$ ингибирующего субстрата FITC-DEVD-fmk, отн. ед.): во фракции «молодых» эритроцитов до (1) и после (2) воздействия 2 мМ t-BHP; в «молодых» эритроцитах, предварительно проинкубированных с ингибитором каспазы-3 Z-VAD-fmk, а затем подвергшихся окислительному стрессу 2 мМ t-BHP (3), и в «старых» эритроцитах (4). Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с 1; # – по сравнению с 2

в 6,4 раза по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации эффекторной каспазы-3 (рис. 1).

В «молодых» эритроцитах, предварительно нагруженных нефлуоресцирующим ингибитором каспаз Z-VAD-fmk – (Z-Val-Ala-Asp-fmk) и далее подвергшихся окислительному стрессу, интенсивность флуоресценции FITC-меченного субстрата не отличалась от таковой в контрольных клетках. Это позволяет заключить, что флуорогенный субстрат FITC-DEVD-fmk подвергается расщеплению в эритроцитах именно активированной каспазой-3. В то же время в «старых» эритроцитах по сравнению с контрольными «молодыми» клетками значительного изменения активности каспазы-3 не обнаружено (рис. 1). Однако следует отметить, что $1,4 \pm 0,3$ % «старых» эритроцитов имели интенсивность флуоресценции FITC-меченного субстрата в 9,8 раза выше, чем контрольные «молодые» клетки.

Экспонирование фосфатидилсерина. Поскольку одним из основных признаков эритроза является перераспределение ФС из внутреннего во внешний монослой плазматической мембраны, для выяснения вопроса о запуске эритроза при окислительном стрессе нами исследовано содержание ФС во внешнем липидном слое как «старых» эритроцитов, так и «молодых» эритроцитов, подвергшихся воздействию t-ВНР. В качестве индикатора использовали FITC-меченный аннексин-V – белок, обладающий высоким сродством к ФС. Как видно из рис. 2, инкубация «молодых» эритроцитов с 2 мМ t-ВНР приводит к увеличению интенсивности флуоресценции FITC-меченного аннексин-V в 30 раз по сравнению с контрольными «молодыми» клетками, что свидетельствует о перераспределении ФС из внутреннего во внешний слой мембраны эритроцитов. В то же время в «молодых» эритроцитах, предварительно нагруженных нефлуоресцентным ингибитором каспаз Z-VAD-fmk и далее подвергшихся окислительному стрессу, интенсивность флуоресценции FITC-меченного аннексин-V не отличалась от таковой в контрольных клетках, из чего следует, что перераспределения ФС из внутреннего во внешний слой плазматической мембраны не происходило. Следует отметить,

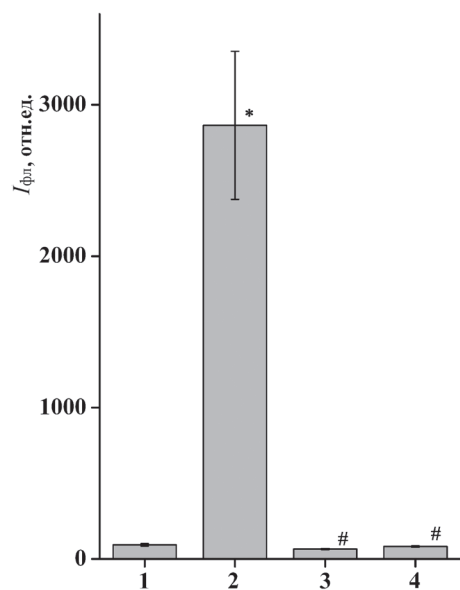


Рис. 2. Экспонирование ФС ($I_{фл}$ FITC-меченного аннексин-V, отн. ед.): на поверхности «молодых» эритроцитов до (1) и после (2) воздействия 2 мМ t-ВНР; на поверхности «молодых» эритроцитов, предварительно проинкубированных с ингибитором каспазы-3 Z-VAD-fmk, а затем подвергшихся окислительному стрессу 2 мМ t-ВНР (3), и «старых» эритроцитов (4). Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с 1; # – по сравнению с 2

что интенсивность флуоресценции FITC-меченного аннексин-V в «старых» клетках и контрольных «молодых» эритроцитах практически не отличалась (рис. 2). В то же время у $2,5 \pm 0,3$ % «старых» эритроцитов интенсивность флуоресценции FITC-меченного аннексин-V была в 15,9 раза выше, чем у контрольных клеток.

Известно, что перераспределению ФС в плазматической мембране эритроцита предшествует снижение жизнеспособности клетки [16]. Для оценки жизнеспособности клеток нами использован флуоресцентный зонд кальцеин АМ. Ацетометильная форма кальцеина легко проникает в эритроциты, где внутриклеточные эстеразы, отщепляют от него ацетометильный радикал, превращая зонд во флуоресцирующий кальцеин, который не способен проникать через клеточную мембрану. Снижение интенсивности флуоресценции кальцеина в клетке свидетельствует о повышенной проницаемости плазматической мембраны вследствие нарушения ее целостности.

Из рис. 3 видно, что в условиях окислительного стресса, индуцированного t-ВНР, происходит резкое снижение интенсивности флуоресценции кальцеина в «молодых» эритроцитах по сравнению с контрольными клетками (2 и 1 соответственно). Обнаружено также снижение интенсивности флуоресценции кальцеина в 2,5 раза в популяции «старых» эритроцитов по сравнению с таковой во фракции «молодых» клеток, что свидетельствует о снижении их жизнеспособности.

Таким образом, снижение жизнеспособности наблюдается как в «молодых» эритроцитах в условиях моделирования эриптоза (t-ВНР-индуцированного окислительного стресса), так и в «старых» эритроцитах в условиях естественного старения клеток.

Заключение. Из полученных экспериментальных данных следует, что окислительный стресс в эритроцитах, вызванный краткосрочным воздействием 2 мМ t-ВНР, приводит к активации каспазы-3, перераспределению ФС из внутреннего во внешний монослой плазматической мембраны, а также к значительному снижению жизнеспособности «молодых» эритроцитов, что свидетельствует о запуске запрограммированной клеточной гибели. Полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии в эритроцитах человека кальций-независимого механизма эриптоза, активируемого окислительным стрессом *in vitro*. Следует отметить и факт гетерогенности популяции «старых» эритроцитов по маркерам эриптоза. Так, небольшое количество «старых» эритроцитов являются аннексин-V-положительными и содержат активированную каспазу-3, но при этом во всей популяции «старых» клеток уровень жизнеспособности снижен.

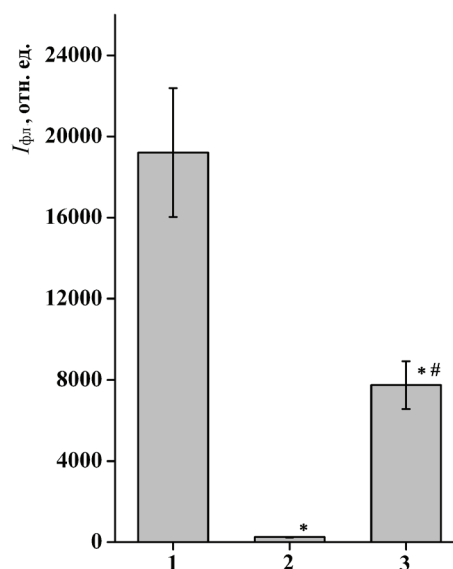


Рис. 3. Изменение жизнеспособности ($I_{\text{фл}}$ кальцеина, отн. ед.) «молодых» эритроцитов до (1) и после (2) воздействия 2 мМ t-ВНР, а также «старых» эритроцитов (3). Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с 1; # – по сравнению с 2

Литература

1. Lang K. S., Lang P. A., Bauer C. et al. // Cell Physiol. Biochem. 2005. Vol. 15, N 5. P. 195–202.
2. Lang F., Gulbins E., Lerche H. et al. // Cell Physiol. Biochem. 2008. Vol. 22, N 5–6. P. 373–380.
3. Белевич Е. И., Костин Д. Г., Слобожанина Е. И. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. ст. междунар. науч. конф., Минск, 19–21 июня 2012 г. Минск, 2012. Ч. 2. С. 216–218.
4. Костин Д. Г., Белевич Е. И., Петрович В. А. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. ст. междунар. науч. конф., Минск, 17–20 июня 2014 г. Минск, 2014. Ч. 1. С. 208–211.
5. Белевич Е. И., Костин Д. Г., Слобожанина Е. И. // Успехи соврем. биологии. 2014. Т. 134, № 2. С. 149–157.
6. Lang F., Gulbins E., Lang P. A. et al. // Cell Physiol. Biochem. 2010. Vol. 26, N 1. P. 21–28.
7. Lang E., Qadri S. M., Lang F. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2012. Vol. 44, N 8. P. 1236–1243.
8. Mandal D. et al. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, N 52. P. 52551–52558.
9. Maellaro E. et al. // Acta Diabetol. 2013. Vol. 50, N 4. P. 489–495.
10. Polak-Jonkisz D. et al. // Clin. Biochem. 2013. Vol. 46. P. 219–224.
11. Bratosin D. et al. // Cytometry A. 2009. N 75A. P. 236–244.
12. Basu S., Banerjee D., Chandra S., Chakrabarti A. // Glycoconj. J. 2010. Vol. 27, N 7–9. P. 717–722.
13. Berg C. P. et al. // Cell Death Differ. 2001. N 8. P. 1197–1206.
14. Wu H. et al. // Int. J. Biol. Sci. 2014. Vol. 10, N 9. P. 1072–1083.
15. Wang K. K. W. // Trends Neurosci. 2000. Vol. 23, N 2. P. 20–26.
16. Calderón-Salinas J. V. et al. // Mol. Cell. Biochem. 2011. Vol. 357, N 1–2. P. 171–179.
17. Mahmud H. et al. // Cardiovasc. Res. 2013. Vol. 98, N 1. P. 37–46.
18. Bratosin D. et al. // Cytometry A. 2005. Vol. 66, N 1. P. 78–84.
19. Corsi D. et al. // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 261. P. 775–783.

K. I. BIALEVICH, D. G. KOSTSIN, E. I. SLOBOZHANINA

CASPASE-3 ACTIVITY IN HUMAN ERYTHROCYTES UNDER OXIDATIVE STRESS

Summary

Activity of caspase-3, exposition of phosphatidylserine on the surface and viability were studied in young fraction of erythrocytes exposed to oxidative stress as well as in old cell fraction. It was shown that oxidative stress in erythrocytes, caused by short-term incubation with 2 mM *tert*-butylhydroperoxide, led to activation of caspase-3, redistribution of phosphatidylserine from inner to outer membrane leaflets as well as significant decrease viability of young cells. All together this data suggest about initiation of eryptosis by a calcium-independent manner activated via oxidative stress *in vitro*.