

ТРАНСПОРТНАЯ АКТИВНОСТЬ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

© 2016 г. А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, Е.И. Слобожанина, А.И. Свирновский*

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
220072, Минск, ул. Академическая, 27, Республика Беларусь;*

**Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
220053, Минск, Долгиновский тракт, 160, Республика Беларусь*

E-mail: Tayzoe@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.15 г.

Изучено влияние лекарственных средств, применяемых при терапии В-хронического лимфоцитарного лейкоза, на функциональную активность мембранного транспортера Р-гликопротеина, ассоциированного с феноменом множественной лекарственной устойчивости, в лимфоцитах пациентов с данным заболеванием. Проведена оценка уровня активных форм кислорода и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в лейкозных клетках в процессе метаболизма химиотерапевтических препаратов. Установлена степень участия низкомолекулярных антиоксидантов в процессах поддержания окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах пациентов с лейкозом после воздействия лекарственных средств. Обнаружено, что изменение уровня активных форм кислорода в лейкозных В-лимфоцитах в определенном интервале значений, как и его дальнейшее восстановление до величины в интактных клетках, приводят к усилению транспортной активности Р-гликопротеина. При воздействии противоопухолевых соединений на лейкозные В-лимфоциты их жизнеспособность снижается и зависит от изменения окислительно-восстановительного баланса. Между транспортной активностью Р-гликопротеина и жизнеспособностью лимфоцитов пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом в процессе детоксикации от лекарственных средств статистически значимых зависимостей не обнаружено, однако в течение 15 ч после воздействия H_2O_2 она напрямую зависит от жизнеспособности лейкозных клеток.

Ключевые слова: В-хронический лимфоцитарный лейкоз, активные формы кислорода, Р-гликопротеин, UIC2-антительный сдвиг, противоопухолевые средства, жизнеспособность лимфоцитов.

В последнее десятилетие появились экспериментальные данные о тесной взаимосвязи между прогрессированием опухолей и клеточным редокс-балансом [1,2]. Показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса (ОВБ) играет ключевую роль в ответной реакции клетки на воздействие противоопухолевых агентов и является важным регулятором экспрессии белков-транспортеров, ассоциированных с явлением множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) [3,4]. Однако вопрос о влиянии редокс-дисбаланса в опухолевых клетках человека на функциональную активность белков МЛУ до

сих пор не изучен. Единичные работы в этой области были выполнены лишь на клетках мышиногo лимфолейкоза [5]. Проведение таких исследований определяется необходимостью объяснения возможных неудач традиционной химиотерапии и модификации ее протоколов с учетом особенностей функционирования транспортеров, ассоциированных с МЛУ, при изменении клеточного редокс-баланса и разработки в перспективе адекватной стратегии лечения при опухолевых заболеваниях кроветворной ткани человека.

Ранее нами было показано, что увеличение уровня активных форм кислорода (АФК) в В-лимфоцитах доноров сверх физиологического диапазона, вызванное метаболизмом лекарственных средств, применяемых при терапии В-хронического лимфоцитарного лейкоза (В-ХЛЛ), в течение 15 ч или прямым воздействием

Сокращения: ОВБ – окислительно-восстановительный баланс, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, АФК – активные формы кислорода, В-ХЛЛ – В-хронический лимфоцитарный лейкоз, Р-gp – Р-гликопротеин, НА – низкомолекулярные антиоксиданты, НАС – N-ацетил-L-цистеин.

H_2O_2 , приводит к ингибированию функциональной активности Р-гликопротеина (Р-gp) – одного из основных белков МЛУ [6]. Смещение ОВБ в обратную сторону или его восстановление до значений в интактных клетках вызвало усиление транспортной активности данного белка в В-лимфоцитах доноров [6].

В данной работе исследовали влияние химиотерапевтических препаратов на содержание АФК и низкомолекулярных антиоксидантов (НА) в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ, а также провели оценку транспортной активности Р-gp в этих клетках. Это позволило охарактеризовать функционирование основного транспортера, ассоциированного с МЛУ, при изменении редокс-баланса, вызванного метаболизмом исследуемых лекарственных средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали кровь пациентов с В-ХЛЛ, которую получали из Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий и 9-й городской клинической больницы г. Минска. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности гистотака согласно классической методике [7]. Инкубацию клеток проводили в питательной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в увлажненной атмосфере с 5%-м содержанием CO_2 при температуре 37°C в течение 1, 15 или 38 ч, затем отмывали в течение 10 мин при 300 g от химиопрепаратов в натрий-фосфатном буфере (2 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4).

Уровень активных форм кислорода в лимфоцитах оценивали с помощью флуоресцентного зонда 5-(и 6)-хлорметил-2',7'-дихлороди-гидрофлуоресцеин диацетата (CM- H_2DCFDA , Molecular Probes, США) на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson, США) в FITC-Н-канале согласно методу [8]. Итоговые данные для этого метода представлены в виде средней интенсивности флуоресценции 5-хлорметил-2',7'-дихлорофлуоресцеина (CM-DCF) в относительных приборных единицах ($I_{фл}$, отн. ед). При определении интенсивности флуоресценции CM-DCF учитывали только жизнеспособные лимфоциты. Клетки, не окрашенные CM-DCF, из анализа исключали.

Измерение количества низкомолекулярных антиоксидантов в лейкозных лимфоцитах проводили с помощью коммерческого набора «Antioxidant assay kit» (Sigma, США) согласно про-

токолу, предложенному разработчиками [9]. Спектрофотометрические измерения проводили на универсальном анализаторе Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer, США) при длине волны 405 нм. Содержание НА в лимфоцитах определяли по эквиваленту концентрации Trolox (водорастворимого аналога витамина E).

Оценку жизнеспособности лимфоцитов проводили с использованием кальцеина-АМ и пропидиум иодида (Sigma, США), как описано в работе [10]. Для этого лимфоциты инкубировали в натрий-фосфатном буфере с 0,1 мкМ кальцеина-АМ в течение 30 мин при 37°C, затем проводили отмывку от красителя и инкубировали с пропидиум иодидом в течение 15 мин. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II в FITC-Н- и APC-Н-каналах. Жизнеспособными считали клетки, меченные кальцеином и не окрашенные пропидиум иодидом. Полученные результаты для этого метода представлены в виде отношения среднего значения интенсивности флуоресценции кальцеина после воздействия химиопрепарата, N-ацетил-L-цистеина (НАС) или H_2O_2 ($I_{фл}$) к интенсивности флуоресценции кальцеина в необработанных клетках ($I_{фл.к}$), выраженного в процентах.

Количество В-лимфоцитов определяли по степени связывания с фикоэритринцианином 5.1 (PC5)-конъюгированными моноклональными антителами CD19 (клон J3-119), неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG1 (Immunotech, Чехия).

Количество CD5-позитивных клеток среди В-лимфоцитов определяли по степени связывания с FITC-конъюгированными моноклональными антителами CD5 (клон BL1a), неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG2a (Immunotech, Чехия).

Экспрессию Р-гликопротеина оценивали с помощью фикоэритрин-конъюгированных моноклональных антител (клон UIC2), неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG2a (Immunotech, Чехия).

Функциональную активность Р-гликопротеина определяли методом «UIC2-антительного сдвига» согласно работе [11]. Этот тест основывается на изменении реактивности анти-Р-gp-моноклональных антител, UIC2, в присутствии транспортируемых этим белком соединений при физиологических условиях. Результирующие данные по функциональной активности Р-gp представлены в виде отношения количества лимфоцитов, связавшихся с UIC2 после воздействия химического агента (Pgp⁺), к количеству лимфоцитов, связавшихся с UIC2 в

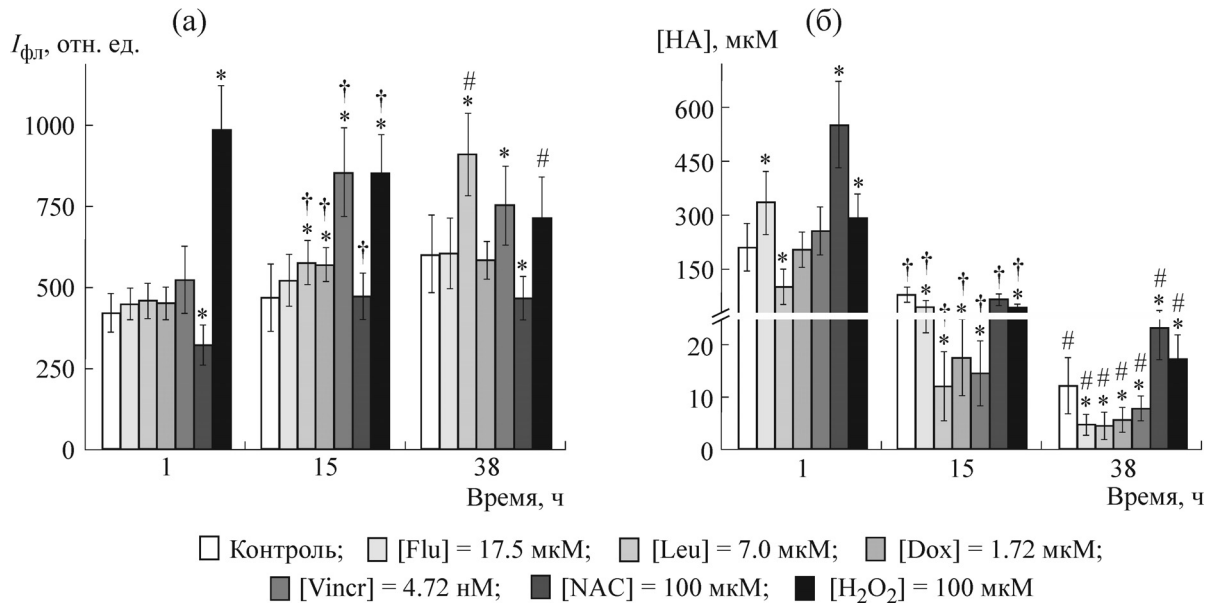


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции CM-DCF (а) и содержание низкомолекулярных антиоксидантов (б) в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия противоопухолевых средств, NAC и H₂O₂ *in vitro*. Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF и содержание НА в лейкозных лимфоцитах до воздействия противоопухолевых средств, NAC и H₂O₂ приняты в качестве контроля (* – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$); † – различия достоверны по сравнению с 1 ч ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с 15 ч ($p < 0,05$)).

контрольной пробе (Pgr⁺), выраженного в процентах. Анализ жизнеспособных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS-Santo II в фикоэритрин-Н-канале.

Для изменения ОБВ в лейкозных лимфоцитах использовали терапевтические концентрации противоопухолевых препаратов трех различных классов, применяемых при лечении В-ХЛЛ: нуклеозидные аналоги (флударабел, 17,5 μM и лейкладин, 7,0 μM – отечественные варианты (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь) соответственно флударабина и кладрибина), антрациклины (доксорубин, 1,72 μM (Sigma, США) и винка-алкалоиды (винкристин, 47,2 нМ (ООО «Лэнс-фарм», Россия)). В качестве положительного контроля содержания АФК в клетках использовали 100 μM пероксида водорода (Sigma, США), в качестве отрицательного – 100 μM N-ацетил-L-цистеина (Sigma, США).

В работе приведены средние значения из четырех–семи независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена (r_s). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что количество CD5-позитивных клеток среди В-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров составляет не более 25% от их общего числа [12]. В наших исследованиях процентное содержание В-лимфоцитов в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ находилось в диапазоне 85–95%. Причем количество CD5-позитивных лимфоцитов составляло 80–90% среди В-клеток (данные не представлены).

Кратковременное воздействие (1 ч) лекарственных средств, применяемых при терапии В-ХЛЛ, на лейкозные клетки не вызвало статистически значимых отличий в интенсивности флуоресценции CM-DCF по отношению к интактным лимфоцитам (рис. 1а).

Увеличение времени инкубации лимфоцитов (до 15 ч) с лейкладином, доксорубицином и винкристином приводило к статистически достоверному увеличению продукции АФК в лейкозных клетках в среднем на 20–25% (для лейкладина и доксорубина) и 80–85% (для винкристина) по сравнению с контролем, для флударабела наблюдалась лишь тенденция к накоплению АФК (рис. 1а). Дальнейшее увеличение времени экспозиции (до 38 ч) лимфоцитов с флударабелом и доксорубицином приводило к восстановлению уровня АФК в лимфоцитах па-

циентов с В-ХЛЛ до значений в интактных клетках. После инкубации лейкозных клеток с лейкокладином и винкристином уровень АФК в них статистически достоверно превышал контрольные значения (рис. 1а) в среднем на 20–30% (для винкристина) и 45–55% (для лейкокладина).

Краткосрочное воздействие (20 мин) H_2O_2 приводило к статистически достоверному увеличению интенсивности флуоресценции 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в лейкозных лимфоцитах спустя 1 и 15 ч после воздействия по сравнению с интактными клетками (рис. 1а). Причем через 1 ч после воздействия H_2O_2 уровень АФК в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ превышал контрольные значения в среднем в 2,1–2,3 раза, а спустя 15 ч – на 80–85%. Через 38 ч инкубации клеток в среде RPMI 1640 после воздействия H_2O_2 содержание АФК было практически сопоставимо с контрольными значениями (рис. 1а).

Инкубация лейкозных В-лимфоцитов с антиоксидантом НАС в течение 1 и 38 ч приводила к статистически достоверному снижению интенсивности флуоресценции 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в среднем на 20–30% по сравнению с интактными клетками, после экспозиции клеток с НАС в течение 15 ч интенсивность флуоресценции красителя восстанавливалась до контрольных значений (рис. 1а).

Для уточнения степени участия НА в процессах поддержания ОВБ после воздействия лекарственных средств, НАС и H_2O_2 в лейкозных лимфоцитах была определена их концентрация (рис. 1б).

Содержание НА в интактных лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ, выраженное в Tg α lox-эквиваленте, после 1 ч инкубации в среде RPMI 1640 составило $209,1 \pm 66,2$ мкМ (рис. 1б). Дальнейшее увеличение времени инкубации до 15 и 38 ч приводило к снижению этого значения соответственно до $75,8 \pm 20,7$ и $12,2 \pm 5,5$ мкМ. Как известно, данный метод не специфичен к содержанию α -токоферола и способен также затрагивать аскорбаты и флавоноиды [13], что позволяет говорить об общей «низкомолекулярной» антиоксидантной способности исследуемых клеток.

Наблюдаемое снижение концентрации НА в интактных клетках может указывать как на снижение пула глутатиона в процессе долгосрочной инкубации лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ в среде RPMI-1640 [14], так и на их активное использование для предотвращения развития свободнорадикальных процессов в клетках. В пользу последнего предположения

может выступать тот факт, что пул АФК в интактных лейкозных клетках спустя 15 ч инкубации в среде RPMI 1640 сохраняется на уровне 1 ч, а спустя 38 ч наблюдается лишь тенденция к увеличению содержания АФК (рис. 1а).

Воздействие аналогов пуриновых нуклеозидов в течение 1 ч вызывает достоверные изменения в содержании НА в лейкозных лимфоцитах по сравнению с контролем. Причем после инкубации с флударабелом их концентрация увеличивается в среднем на 55–65%, а воздействие лейкокладина вызывает снижение их содержания в среднем на 50–60% по сравнению с интактными клетками (рис. 1б). Краткосрочное воздействие доксорубицина не вызывает изменений в антиоксидантной способности лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ, а после инкубации с винкристином – наблюдается тенденция к увеличению содержания НА, однако результаты статистически не достоверны.

Стоит отметить, что содержание АФК в лейкозных клетках спустя 1 ч после воздействия лекарственных средств практически не изменяется по сравнению с контролем (рис. 1а). Однако корреляционный анализ между пулом АФК и содержанием НА в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия исследуемых лекарственных средств (независимо от их класса) в течение 1 ч выявил статистически значимую обратную зависимость между данными процессами ($r_s = -0,72$; $p = 0,019$). Этот факт указывает на участие НА в поддержании ОВБ в лейкозных лимфоцитах спустя 1 ч после воздействия исследуемых противоопухолевых средств.

После 15 ч экспозиции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ со всеми исследуемыми лекарственными средствами происходит статистически достоверное снижение количества НА по сравнению с контролем. При этом после воздействия флударабела антиоксидантная способность лейкозных клеток снижается в среднем на 40–50%, а после инкубации с лейкокладином, доксорубицином и винкристином – на 70–90% по сравнению с интактными клетками (рис. 1б).

Параллельно с этим увеличивается содержание АФК спустя 15 ч инкубации лейкозных клеток с химиопрепаратами, статистические значимые отличия установлены для лейкокладина, доксорубицина и винкристина (рис. 1а). Проведенный корреляционный анализ между пулом АФК и содержанием НА в лейкозных лимфоцитах спустя 15 ч инкубации с химиопрепаратами также выявил статистически значимую обратную зависимость между наблюдаемыми процессами ($r_s = -0,78$, $p = 0,008$). По сравнению

с 1-часовой инкубацией коэффициент корреляции возрос и усилилась степень статистической значимости, что указывает на усиление роли НА при развитии свободнорадикальных процессов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ спустя 15 ч после воздействия исследуемых лекарственных средств.

Увеличение времени экспозиции лейкозных лимфоцитов с лекарственными средствами до 38 ч также приводит к снижению содержания НА как по сравнению с 15 ч инкубацией, так и относительно интактных клеток. После воздействия винкристина снижение содержания НА в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ составило в среднем 30–40%, а после экспозиции с флударабелом, лейкладином и доксорубицином – 50–70% по сравнению с контролем (рис. 1б). Корреляционный анализ между уровнем АФК и содержанием НА в лейкозных клетках спустя 38 ч после воздействия лекарственных средств выявил прямую зависимость между исследуемыми процессами ($r_s = 0,61$) при $p = 0,06$, близкому к статистически значимому. Полученный результат может указывать на возросшее участие ферментов антиоксидантной системы защиты лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ (каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутаза и т.п.) в поддержании ОВБ после инкубации с лекарственными средствами в течение 38 ч.

В качестве положительного контроля содержания НА в лейкозных лимфоцитах был использован НАС, краткосрочное воздействие которого (1 ч) приводило к увеличению количества НА в среднем в 2,5–2,8 раза по сравнению с интактными клетками (рис. 1б). Данное увеличение также соответствовало снижению интенсивности 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после инкубации с НАС в течение 1 ч (рис. 1а). Спустя 15 ч инкубации с НАС наблюдалась тенденция к снижению содержания НА в лейкозных клетках, однако результаты статистически не достоверны (рис. 1б). Полученный результат также соответствовал отсутствию изменения содержания АФК в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия НАС в течение 15 ч (рис. 1а).

Дальнейшее увеличение времени экспозиции клеток с НАС (до 38 ч) приводило к увеличению содержания НА в лейкозных лимфоцитах в среднем на 85–95% по сравнению с интактными клетками, что также соответствовало снижению количества АФК в лимфоцитах спустя 38 ч инкубации с НАС (рис. 1). Проведенный корреляционный анализ между пулом АФК и содержанием НА в лимфоцитах пациентов с В-

ХЛЛ после воздействия НАС в течение 38 ч подтвердил наличие статистически значимой обратной зависимости между наблюдаемыми изменениями ($r_s = -0,83$; $p = 0,041$), что указывает на значительное участие НА в поддержании ОВБ в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ.

В качестве донора АФК для отрицательного контроля содержания НА в лейкозных клетках был использован H_2O_2 . Спустя 1 ч после его краткосрочного воздействия (20 мин) наблюдали увеличение количества НА в лимфоцитах в среднем на 35–45% по сравнению с интактными клетками. Данное увеличение соответствовало возрастанию содержания АФК в лейкозных клетках в среднем в 2,1–2,3 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Увеличение времени инкубации лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ до 15 и 38 ч в среде RPMI 1640 после воздействия H_2O_2 приводило соответственно к снижению содержания НА в среднем на 45–55% и увеличению их количества в среднем на 40–50% по сравнению с интактными клетками. Параллельно с этим через 15 ч после воздействия H_2O_2 в лейкозных клетках наблюдали статистически достоверное увеличение количества АФК в среднем на 80–85%, а через 38 ч – лишь тенденцию к увеличению (рис. 1).

Проведенный корреляционный анализ между количеством АФК и содержанием НА в течение 38 ч после воздействия H_2O_2 не выявил статистически значимой зависимости ($r_s = 0,26$; $p = 0,62$). Таким образом, спустя 38 ч после воздействия H_2O_2 в лейкозных лимфоцитах пул АФК восстанавливается практически до контрольных значений (рис. 1а), что сопровождается двукратным снижением или увеличением на 40% содержания НА соответственно через 15 и 38 ч после воздействия H_2O_2 . Полученный результат может свидетельствовать лишь о частичном участии непосредственно НА в восстановлении редокс-баланса в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после окислительного стресса.

Параллельно с оценкой изменения ОВБ после воздействия лекарственных средств, применяемых при терапии В-ХЛЛ, в лейкозных лимфоцитах было проведено определение функциональной активности Р-gp (рис. 2а). Воздействие всех исследуемых лекарственных средств, применяемых при терапии В-ХЛЛ, на клетки в течение 1 ч не приводило к изменению иммунореактивности UIC2 по сравнению с контролем (рис. 2а).

Увеличение времени экспозиции со всеми лекарственными средствами до 15 ч (кроме доксорубицина) приводило к статистически достоверному усилению иммунореактивности UIC2 в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ по сравне-

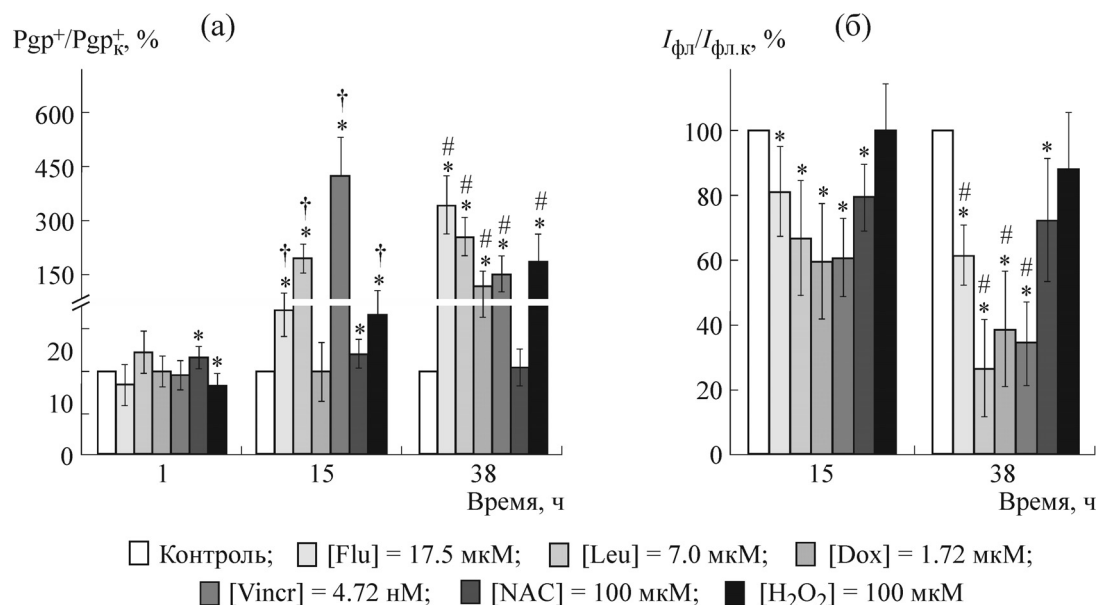


Рис. 2. Относительное содержание UIC2-положительных клеток (а) и относительная интенсивность флуоресценции кальцеина (б) в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия лекарственных средств, NAC и H₂O₂ *in vitro*. Величина процентного содержания UIC2-положительных клеток и значение интенсивности флуоресценции кальцеина в лейкозных лимфоцитах до воздействия противоопухолевых средств, NAC и H₂O₂ приняты за 100% (контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$); † – различия достоверны по сравнению с 1 ч ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с 15 ч ($p < 0,05$).

нию с интактными клетками, что указывает на увеличение транспортной активности Р-гр. В максимальной степени функциональная активность проявлялась после воздействия винкристина (в 8,1–9,0 раза превышала контрольную), в минимальной – после инкубации с флударабелом (на 60–80% выше, чем в интактных клетках), экспозиция с лейкладином приводила к усилению каталитического цикла транспортера в 3,7–4,2 раза относительно контроля. После воздействия доксорубина в течение 15 ч иммунореактивность UIC2 в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ не отличалась от интактных клеток (рис. 2а).

Дальнейшее увеличение времени инкубации (до 38 ч) лейкозных клеток со всеми лекарственными средствами также приводило к статистически достоверному усилению иммунореактивности UIC2 по сравнению с контролем. В максимальной степени транспортную активность Р-гр регистрировали после воздействия аналогов пуриновых нуклеозидов (для флударабела и лейкладина она соответственно в 6,5–7,3 раза и в 4,9–5,5 раза превышала контрольную), в минимальной – после инкубации с доксорубином (в 2,2–2,7 раза выше, чем в интактных клетках), а экспозиция с винкристином приводила к усилению каталитического цикла транспортера в 2,9–3,4 раза относительно контроля (рис. 2а).

При смещении ОВБ с помощью NAC и H₂O₂ в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ также происходило изменение иммунореактивности UIC2. Причем краткосрочная инкубация (1 ч) лейкозных клеток в RPMI 1640 после воздействия H₂O₂ в течение 20 мин приводила к статистически достоверному снижению процентного содержания Р-гр в среднем на 20–25% по сравнению с контролем. Спустя 15 ч после воздействия H₂O₂ происходило увеличение иммунореактивности UIC2 в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ в среднем на 60–70%, а через 38 ч – в 3,6–4,0 раза по сравнению с интактными клетками (рис. 2а).

Краткосрочная инкубация лейкозных лимфоцитов с NAC (1 ч) приводила к увеличению процента Р-гр-положительных клеток в среднем на 15–20% по сравнению с контролем. Через 15 ч инкубация лимфоцитов с NAC также приводила к усилению иммунореактивности UIC2 в среднем на 20–25% относительно интактных клеток, а через 38 ч она восстанавливалась до контрольных значений (рис. 2а).

Таким образом, как и в случае с лимфоцитами доноров [6], транспортер Р-гр также участвует в процессах детоксикации лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ от исследуемых лекарственных средств, как классических субстратов данного белка (доксорубина и винкристина [15]), так и нуклеозидных аналогов, которые

ими не являются [16]. Также установлено, что транспортная активность Р-гр спустя 15 и 38 ч в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ в несколько раз превосходит таковую в суммарной популяции и в В-лимфоцитах доноров, как было показано нами ранее [6]. Причем степень экспрессии белка в суммарной популяции лимфоцитов доноров была снижена незначительно (в 1,3–2,1 раза) относительно лейкозных клеток в течение всего интервала регистрации (38 ч).

Стоит отметить, что транспортная активность Р-гр изменяется в зависимости от времени ее регистрации и применяемого лекарственного средства: через 15 ч она проявляется в максимальной степени для винкристина, а через 38 ч – для флударабела (рис. 2а). Данный факт указывает на изменение субстратной специфичности исследуемого транспортера, что может объясняться структурными особенностями вновь синтезированного белка, так как известно, что Р-гр начинает регистрироваться на плазматической мембране клеток HeLa спустя 20–24 ч после трансфекции гена *mdr1*, ответственного за его кодирование [17].

Параллельно с оценкой функциональной активности Р-гр и уровня АФК в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ была определена их жизнеспособность после воздействия лекарственных средств (рис. 2б). Показано, что после воздействия флударабела и НАС в течение 15 ч происходило статистически достоверное снижение интенсивности флуоресценции кальцеина в лейкозных лимфоцитах в среднем на 15–25% по сравнению с интактными клетками. Инкубация клеток с доксорубицином и винкристином приводила к снижению эстеразной активности клеток в среднем на 35–45%, а с лейкладином – в среднем на 30–35% относительно контроля. Культивирование лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ в среде RPMI 1640 в течение 15 ч после краткосрочного воздействия H_2O_2 не влияло на интенсивность флуоресценции кальцеина относительно контроля (рис. 2б), что указывает на сохранение жизнеспособности лейкозными клетками после воздействия H_2O_2 в течение 20 мин.

Дальнейшее увеличение времени экспозиции (до 38 ч) лейкозных лимфоцитов с лекарственными средствами приводило к статистически достоверному снижению относительной интенсивности флуоресценции кальцеина в них по сравнению с 15 ч воздействием (рис. 2б). Минимальное снижение эстеразной активности произошло после воздействия флударабела – на 35–45%, максимальное – после инкубации с лейкладином – на 70–80%, а воздействие доксорубицина и винкристина снижало эстеразную

активность в среднем на 60–70% по сравнению с интактными лимфоцитами. Инкубация лейкозных клеток с НАС в течение 38 ч приводила к снижению интенсивности флуоресценции кальцеина в среднем на 25–30% по сравнению с контролем. Культивирование лейкозных клеток в течение 38 ч в среде RPMI 1640 после воздействия H_2O_2 (20 мин) не приводило к статистически значимому изменению эстеразной активности относительно контроля, однако наблюдалась тенденция к ее снижению (рис. 2б).

Для ответа на вопрос, в какой степени связана жизнеспособность лимфоцитов пациентов при В-ХЛЛ с функционированием Р-гр и изменением ОВБ, вызванного воздействием лекарственных средств, НАС и H_2O_2 , провели корреляционный анализ между параметрами, отражающими эстеразную активность, функционирование Р-гр и изменение содержания АФК в этих клетках. Показано, что через 15 и 38 ч в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ пул АФК снижается (после краткосрочного воздействия H_2O_2), но транспортная активность Р-гр возрастает (рис. 1а, 2а), причем в течение 15 ч после воздействия H_2O_2 она напрямую связана с концентрацией АФК ($r_s = 0,71$; $p = 0,047$).

Воздействие противоопухолевых соединений на лимфоциты пациентов с В-ХЛЛ также приводило к изменению ОВБ (рис. 1а), что коррелировало с транспортной активностью Р-гр в лейкозных клетках, измеренной спустя 15 ч ($r_s = 0,47$; $p = 0,037$), однако в В-лимфоцитах доноров в процессе детоксикации от лекарственных средств изменение ОВБ ингибировало активность Р-гр (15 ч: $r_s = -0,73$; $p = 0,0073$) [6].

Таким образом, превышение уровня АФК в лейкозных В-лимфоцитах относительно значений физиологического диапазона на 20–90%, как и его снижение на 20–30% или восстановление до величины в интактных клетках, приводило к усилению функциональной активности Р-гр. С другой стороны, более высокие концентрации АФК способны ингибировать транспортную активность Р-гр в этих клетках, что наглядно продемонстрировано спустя 1 ч после краткосрочного воздействия H_2O_2 (рис. 1а, 2а).

Полученные результаты могут свидетельствовать об образовании дополнительных дисульфидных связей в структуре белка, что может привести к изменению его конформации и, как следствие, – к изменению функциональной активности. Подобный механизм был продемонстрирован для белка множественной лекарственной резистентности 1, который также ассоциирован с явлением МЛУ [18]. Также известно, что этот белок, как и Р-гр, относится к АТФ-

зависимым транспортерам суперсемейства ABC, которые снижают внутриклеточную концентрацию лекарственных соединений путем их выброса из клеток с использованием энергии гидролиза АТФ [19]. В работе [20] было показано, что при краткосрочном воздействии H_2O_2 (15 мин) в концентрации 100 мкМ происходит двухкратное снижение пула АТФ в лимфоцитах периферической крови доноров. Таким образом, наблюдаемое нами ингибирование транспортной активности Р-гр после краткосрочного воздействия H_2O_2 может определяться истощением пула АТФ в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ. Не стоит также исключать сочетанного вклада рассмотренных механизмов в наблюдаемые результаты.

Выше было показано, что в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ и в В-лимфоцитах доноров характер регуляции транспортной активности Р-гр посредством АФК после воздействия противоопухолевых соединений противоположен. Транспортная активность Р-гр в лейкозных лимфоцитах также значительно превышает таковую в В-лимфоцитах доноров. При этом в обоих случаях нами использовались терапевтические концентрации лекарственных средств. Эти особенности могут объясняться различным содержанием АТФ в этих клетках. Высказанное предположение хорошо подтверждается работой [21], в которой показано, что пул АТФ в лейкозных клетках в 20 раз превышал таковой в нормальных лимфоцитах.

Стоит отметить, что изменение ОВБ в В-лимфоцитах доноров, вызванное воздействием противоопухолевых средств, обуславливало их жизнеспособность (38 ч: $r_s = -0,69$, $p = 0,014$) [6]. Жизнеспособность лимфоцитов при В-ХЛЛ также определялась изменением ОВБ в процессе метаболизма химиопрепаратов, но в меньшей степени, чем В-лимфоцитов доноров (38 ч: $r_s = -0,45$, $p = 0,012$). Однако при исключении из выборки винкристина и доксорубицина направленность зависимости сохранялась, а коэффициент корреляции статистически достоверно увеличился (38 ч: $r_s = -0,64$, $p = 0,013$). При учете лекарственных средств по отдельности, их воздействие в течение 38 ч также приводило к обратным зависимостям между пулом АФК и эстеразной активностью в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ, но результаты были статистически не достоверны.

Ранее нами показано, что жизнеспособность В-лимфоцитов доноров после инкубации с лекарственными средствами, применяемыми при терапии В-ХЛЛ, в определенном временном интервале (в течение 15 ч) зависела от транспортной активности Р-гр ($r_s = 0,72$, $p = 0,0082$)

[6]. Однако в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ подобных зависимостей обнаружить не удалось, что может указывать на участие дополнительных транспортеров, ассоциированных с МЛУ (например, белка множественной лекарственной резистентности 1), в процессах детоксикации, определяющих выживаемость лейкозных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Wartenberg, E. Hoffmann, H. Schwindt, et al., *FEBS Lett.* **579** (20), 4541 (2005).
2. Н. В. Ермакова, Дис. ... канд. биол. наук (Пушино, ИТЭБ РАН, 2005).
3. M. T. Kuo, *Antioxid. Redox. Signal.* **11** (1), 99 (2009).
4. W.-S. Jin, Zh. Kong, Zh. Shen, et al., <http://www.jeccr.com/content/30/1/61/> - ins2 *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30** (61), 1 (2011)
5. М. О. Емельянов, Ю. А. Ким, А. Ф. Корыстова и Л.Н. Кублик, *Биол. мембраны* **27** (3), 244 (2010).
6. А. В. Тамашевский, Ю. М. Гармаза, Е. И. Слободжанина и А. И. Свириновский, *Новости мед.-биол. наук* **6** (4), 173 (2012).
7. N. Gadol, G. Nakamura, and A. Saunders, *Diagn. Immunol.* **3** (3), 145 (1985).
8. J. Chandra, J. Hackbarth, S. Le, et al., *Blood* **102** (13), 4512 (2003).
9. Sigma Aldrich [Electronic resource] / Antioxidant Assay Kit (2012). Mode of access: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0790bul.pdf>. – Date of access: 28.11.2014.
10. P. F.R. Palma, G. L. Baggio, C. Spada, et al., *Brazil. J. Infectious Diseases* **12** (2), 108 (2008).
11. E. B. Mechetner, B. Schott, B. S. Morse, et al., *Biochemistry* **94** (24), 12908 (1997).
12. E. Cabezudo, E. Matutes, M. Ramrattan, et al., *Leukemia* **11** (11), 909 (1997).
13. D. D. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, and S. Locke, *FEBS Lett.* **187** (1), 33 (1985).
14. R. Silber, C. M. Farber, E. Papadopoulos, et al., *Blood* **80** (8), 2038 (1992).
15. G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, et al., *Nature Rev. Drug Discov.* **5** (3), 219 (2006).
16. C. A. Koczor, R. A. Torres, and W. Lewis, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8** (6), 665 (2012).
17. D. Fu, M. Bebawy, E. P. W. Kable, et al., *Int. J. Cancer* **109** (2), 174 (2004).
18. Y. Yang, Y. Liu, Z. Dong, et al., *J. Biol. Chem.* **282** (12), 8821 (2007).
19. А. А. Ставровская, *Биол. мембраны* **20** (3), 196 (2003).
20. M. J. Smit and R. Anderson, *Agents Actions* **36** (1–2), 58 (1992).
21. R. Jitschin, A. D. Hofmann, H. Bruns, et al., *Blood* **123** (17), 2663 (2014). <http://www.bloodjournal.org/content/123/17/2663.long?ssso-checked=true> - aff-1

P-Glycoprotein Transport Activity under Redox Balance Changes in Lymphocytes of Patients with B-Chronic Lymphocytic Leukemia

A.V. Tamashevski*, Y.M. Harmaza*, E.I. Slobozhanina*, and A.I. Svirnovski**

**Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220072 Belarus*

***Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies,
Dolginovskii Tract, 160, Minsk, 220053 Belarus*

The effect of drugs, applied in treatment of B-chronic lymphocytic leukemia, on the functional activity of membrane transporter P-glycoprotein, associated with the phenomenon of multidrug resistance in lymphocytes of patients with B-chronic lymphocytic leukemia, is studied. The level of reactive oxygen species and low-molecular-weight antioxidants content are evaluated in leukemic cells during metabolism of chemotherapeutic drugs. After drug exposure, the extent of contribution of low-molecular-weight antioxidants to the maintenance of redox balance in lymphocytes of patients with B-chronic lymphocytic leukemia was determined. It is found that an alteration in the level of reactive oxygen species in the leukemic B-lymphocytes within a specified range of values and also further recovery for this level up to the value as in intact cells lead to an increase in P-glycoprotein transport activity. The viability of leukemic B-cells under exposure to the antitumor drugs decreases and depends on the redox balance changes. No statistically significant relationship between P-glycoprotein transport activity and viability of lymphocytes of patients with B-chronic lymphocytic leukemia during drug detoxication was detected, however, during 15 h after H₂O₂ exposure P-glycoprotein activity directly depends on viability of the leukemic cells.

Key words: B-chronic lymphocytic leukemia, reactive oxygen species, P-glycoprotein, UIC2-shift, anticancer drugs, viability of lymphocytes