

Васильева Ольга Александровна, канд. мед. наук, ассистент кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ, г. Томск.

E-mail: vasiljeva-24@yandex.ru

Область научных интересов: молекулярная медицина, дифференцировка Т-лимфоцитов, галектины, апоптоз.

Исаева Анна Владимировна, аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

E-mail: seneann@mail.ru

Область научных интересов: механизмы опухолевой трансформации, цитогенетика, внутриклеточный сигналинг.

Рязанцева Наталья Владимировна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ, г. Томск.

E-mail: nv_ryazan@mail.ru

Область научных интересов: внутриклеточный сигналинг, регуляция апоптоза, трансляционная медицина.

УДК 616:612.017.1

ВЛИЯНИЕ ГАЛЕКТИНА-3 НА АПОПТОЗ АКТИВИРОВАННЫХ IN VITRO CD4⁺-ЛИМФОЦИТОВ

О.А. Васильева, А.В. Исаева, Н.В. Рязанцева

Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск

E-mail: vasiljeva-24@yandex.ru

Одним из быстро развивающихся направлений науки является гликобиология, изучающая лектин-углеводные взаимодействия. В качестве перспективных регуляторов клеточного гомеостаза в настоящее время рассматриваются эндогенные гликансвязывающие белки семейства лектинов – галектины. Галектин-3 является многофункциональным белком, участвующим в регуляции жизненного цикла клеток, однако остаются малоизученными его проапоптотические эффекты в отношении CD4⁺-лимфоцитов. Целью работы явилось изучение влияния галектина-3 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов in vitro. Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и культивировали с добавлением рекомбинантного галектина-3. Активность апоптоза CD4⁺-лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии по выходу фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, увеличению проницаемости для витального красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD) и снижению потенциала митохондрий. Добавление галектина-3 в диапазоне доз от 1,0 до 2,5 мкг/мл приводило к значительному повышению содержания Annexin⁺7AAD⁺-CD4⁺-лимфоцитов. При этом достоверно увеличивалось количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий. Установлено, что галектин-3 оказывает дозозависимое проапоптотическое действие на CD4⁺-лимфоциты in vitro, характеризующееся увеличением количества клеток с деполаризованной митохондриальной мембраной.

Ключевые слова:

Галектин-3, лимфоциты, апоптоз, митохондриальный потенциал.

Введение

Развитие и функционирование многоклеточных биологических систем зависят от сложных взаимодействий между клетками, формирующими морфофункциональные межсистемные связи в организме. В этих взаимодействиях трудно переоценить роль апоптоза как процесса, определяющего альтруистическое поведение индивидуальных клеток в пользу организма [1].

Высокую актуальность приобрела проблема целенаправленного регулирования программированной гибели клеток с применением средств активации или инактивации молекулярных мишеней при различных патологических процессах.

Перспективными агентами, регулирующими жизненный цикл клетки, являются низкомолекулярные белки семейства лектинов – галектины. К настоящему времени в клетках млекопитающих идентифицированы 15 представителей данного семейства [2].

Галектин-3 относится к галектинам «химерного» типа, который состоит из одного С-концевого углеводсвязывающего домена и одного N-концевого регуляторного домена, содержащего повторяющиеся коллагеноподобные участки, и обладает высокой подвижностью [3].

Галектин-3 секретируется клетками лимфоузлов, тимуса, селезенки, а также лимфоцитами, макрофагами, дендритными и опухолевыми клетками [4, 5]. Известно, что галектин-3 способен взаимодействовать с РНК и РНК-связывающими белками, участвуя в процессе сплайсинга, а также связываться с белками Bcl-2, регулируя апоптоз [6].

Галектин-3 является единственным представителем семейства, который способен запускать апоптоз по внеклеточному и митохондриальному путям, более того, показано, что данный лектин может обладать как про-, так и антиапоптотической активностью [7].

Исследования, посвященные изучению галектина-3, в основном направлены на оценку взаимосвязи наличия галектина-3 и степени злокачественной трансформации клетки. Однако литературные данные свидетельствуют о том, что галектин-3, как и другие представители этого семейства, может влиять на иммунный ответ и тем самым способствовать уходу опухолевых клеток из-под иммунологического надзора. Один из механизмов, позволяющий трансформированным клеткам быть незамеченными иммунной системой, заключается в индукции апоптоза лимфоцитов, находящихся в зоне контакта.

Цель работы: оценить влияние галектина-3 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов *in vitro*.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 16 практически здоровых доноров от 18 до 33 лет, средний возраст составил 23 ± 5 лет. Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом К₃-ЭДТА. Для исследования лимфоциты выделяли из крови методом градиентного центрифугирования. Количество выделенных клеток стандартизировали до $2,0 \times 10^6$ /мл, разбавляя полной питательной средой, состоящей из 90%-й RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Россия), 10%-й инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина.

Выделенные лимфоциты разделяли на несколько культур, культивирование которых проводили в специализированных 48 луночных стерильных планшетах с крышкой (BD FalconTM, США). Для создания *in vitro* условий, близких к естественным, использовали моноклональные активирующие антитела – анти-CD3/анти-CD28 (BD PharmingenTM, США), добавляя их в культуру клеток в концентрациях 1,0 и 2,0 мкг/мл соответственно. Способность рекомбинантного галектина-3 (RnDSystems, США) вызывать апоптоз лимфоцитов оценивали в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 мкг/мл. Галектин-3 вводили в культуральную среду для моноклеарных лейкоцитов, и клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 18 ч. Контрольную группу составили клетки, культивированные в отсутствие галектина-3. Активность апоптоза CD4⁺-лимфоцитов определяли по выходу фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны и увеличению проницаемости для витального красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD). Для этого клетки окрашивали анти-CD4-ФИТЦ антителами (ООО «Сорбент», Россия), аннексином-V, меченным фикоэритрином (eBioscience, США), и 7AAD (RnDSystems, США) согласно протоколам фирм-производителей. Регистрировали число CD4⁺-лимфоцитов, связавших двойную метку (Annexin⁺7AAD⁺), и число жизнеспособных клеток (Annexin⁻7AAD⁻) на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Для оценки процента клеток со сниженным митохондриальным потенциалом использовали набор DePsipherTM Kit (Trevigen, Inc., USA). Клетки в количестве 1×10^6 отмывали от культуральной среды фосфатно-солевым буфером и добавляли реакционный буфер, содержащий 5 мкг/мл DePsipherTM (JC1), инкубировали при 37 °C, 5 % CO₂ 20 минут. Распределение лимфоцитов по каналам флуоресценции FL1 (JC-мономер) и FL2 (JC-агрегаты) анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Принцип метода основан на том, что флуорохром JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид) способен существовать в двух различных состояниях: агрегатах и мономерах. JC-1-мономер быстро проникает через митохондриальную мембрану живой клетки, в результате чего внутри митохондрии формируются JC-1-агрегаты, характеризующиеся красным спектральным свечением, которое измеряется на FL-2 канале проточного цитометра. При деполяризации митохондриальной мембраны, являющейся ранним признаком апоптоза, JC-1 не накапливается внутри митохондрии и

находится в цитоплазме в виде мономерной формы, которая характеризуется зеленым спектральным свечением, что измеряется на FL-1-канале проточного цитометра.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Шапиро Вилка. Достоверность различий ($P < 0,05$) оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_{25} – Q_{75}).

Результаты и обсуждение

В работе было исследовано *in vitro* влияние галектина-3 на апоптоз $CD4^+$ -лимфоцитов, активированных с помощью антител к CD3 и CD28, имитирующих взаимодействие Т-лимфоцитов с антигенпредставляющими клетками (анти-CD3 связываются с Т-клеточным рецептором, анти-CD28 связываются с гликопротеином CD28 на Т-лимфоцитах). В результате тестирования различных доз рекомбинантного галектина-3 (от 0,5 до 2,5 мкг/мл) было установлено, что в дозе 0,5 мкг/мл изучаемый лектин не вызывает апоптоз лимфоцитов. Однако при добавлении рекомбинантного галектина-3 в диапазоне концентраций от 1,0 до 2,5 мкг/мл регистрировали статистически достоверное дозозависимое увеличение количества аннексинV/7AAD-положительных лимфоцитов ($p < 0,05$) (рис. 1).

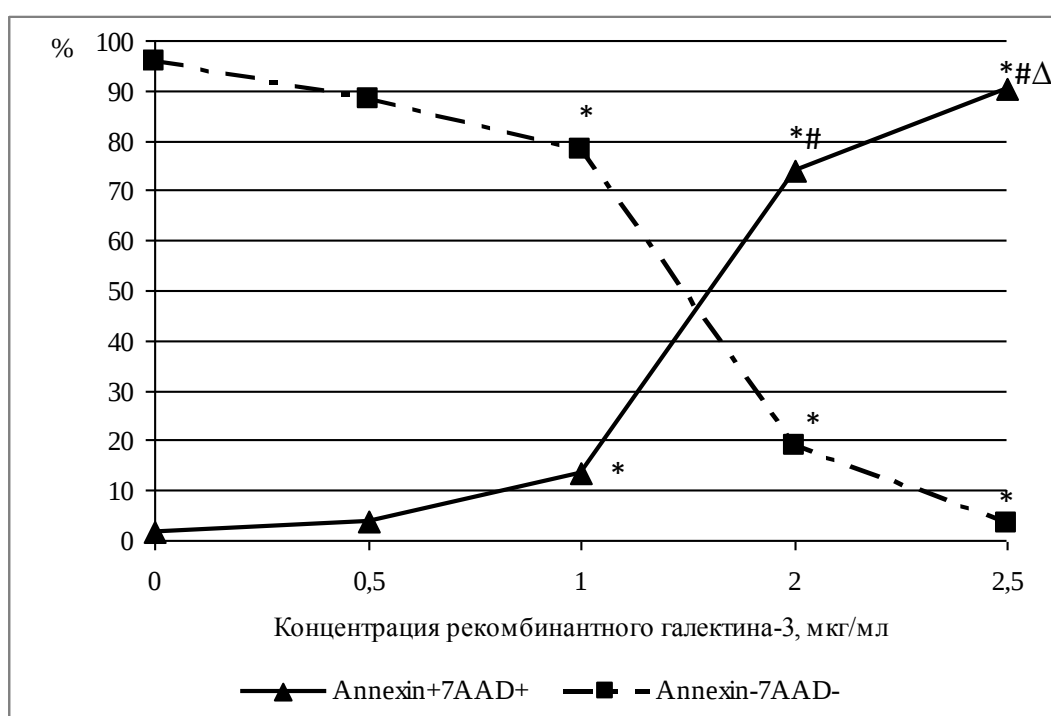


Рис. 1. Количество апоптотически измененных ($Annexin^+7AAD^+$) и жизнеспособных $CD4^+$ -лимфоцитов ($Annexin^-7AAD^-$), активированных антителами к CD3 и CD28, в зависимости от концентрации рекомбинантного галектина-3 в культуральной среде: * – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре лимфоцитов; # – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-3 в дозе 1,0 мкг/мл; Δ – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-3 в дозе 2,0 мкг/мл

Проапоптотические концентрации галектина-3, в которых отмечалось значимое увеличение клеток в состоянии апоптоза, в дальнейшем тестировались при изучении влияния галектина-3 на изменение митохондриального потенциала лимфоцитов. Согласно данным литературы, вероятным механизмом реализации программированной клеточной гибели, индуцирован-

ной галектинами, является митохондриальный путь. Данный вариант запуска программированной клеточной гибели включает изменения в электронном транспорте, снижение митохондриального трансмембранного потенциала [8], изменения клеточного редокс-баланса [9], выход индукторов смерти (цитохром с [10], Smac/DIABLO [11], AIF [12], эндонуклеаза G) и взаимодействие про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [13, 14]. Универсальным признаком данного пути гибели клетки является снижение трансмембранного потенциала митохондрий, образованного градиентом протонов H^+ , за счет активации специфических каналов во внешней митохондриальной мембране [15]. В результате окрашивания клеток, проведенного с помощью митохондриального зонда JC-1, нами было установлено, что в проапоптотических дозах галектин-3 приводит к деполяризации митохондриальной мембраны. Добавление в среду для культивирования лимфоцитов рекомбинантного галектина-3 в дозе 1 мкг/мл сопровождалось увеличением в 2,4 раза количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, при увеличении концентрации галектина-3 до 1,5 и 2,0 мкг/мл регистрировали повышение количества лимфоцитов, содержащих JC-мономеры в 3,3 и 4,6 раз соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Количество лимфоцитов, содержащих JC-мономеры/агрегаты при добавлении проапоптотических доз рекомбинантного галектина-3, Ме (Q_{25} – Q_{75})

Показатель	Контрольная группа	Доза рекомбинантного галектина-3, мкг/мл		
		1,0	1,5	2,0
Количество клеток, содержащих JC-мономеры, %	12,55 (11,10–14,10)	29,95* (26,45–31,30)	41,40* (33,30–46,15)	58,10* (47,42–63,20)
Количество клеток, содержащих JC-агрегаты, %	79,98 (72,40–87,00)	68,45* (64,30–72,40)	56,95* (52,10–63,80)	40,25* (34,20–53,40)

Примечание: «*» – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Программированная клеточная гибель является необходимым механизмом контроля иммунного ответа на различных стадиях лимфопоэза [16]. При этом апоптоз активированных $CD4^+$ -лимфоцитов под действием галектина-3 может иметь как физиологическое, так и патогенетическое значение. С одной стороны, таким способом может осуществляться ауторегуляция, направленная на предотвращение избыточной активации иммунных реакций и защиту здоровых тканей от иммуно-опосредованного повреждения. С другой стороны, гибель лимфоцитов под действием галектинов, секретируемых опухолевыми клетками, способствует опухолевой прогрессии в результате формирующейся иммуносупрессии. Способность секретировать галектин-3 показана для клеток колоректального рака, предстательной и щитовидной железы, меланомы и новообразований других локализаций [17]. При этом галектин-3 является не только прогностическим маркером и важным фактором злокачественного потенциала опухолей, но и обладает выраженным проапоптотическим действием на лимфоциты, осуществляющие иммунологический контроль.

Выводы

В результате исследования влияния рекомбинантного галектина-3 на реализацию программированной гибели лимфоцитов установлено, что галектин-3 оказывает дозозависимое проапоптотическое действие на $CD4^+$ -лимфоциты *in vitro*, характеризующееся увеличением количества клеток с деполяризованной митохондриальной мембраной. Учитывая, что галектин-3 в больших количествах способен секретироваться опухолевыми клетками и индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов, то данный белок может рассматриваться в качестве перспективной терапевтической мишени при опухолевых заболеваниях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (№ НШ-4184.2014.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фармакологическое регулирование программированной гибели клеток / Под ред. В.А. Черешнева. – СПб.: Наука, 2011. – 255 с.
2. Рапопорт Е.М., Почечуева Т.В., Курмышкина О.В. и др. Твердофазные системы для исследования углеводной специфичности галектинов // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 3. – С. 380–390.
3. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – № 4. – С. 483–497.
4. Васильева О.А., Якушина В.Д., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Возможности использования галектина-3 в лабораторной диагностике (мини обзор). Клинико-лабораторный консилиум. 38, 12–16.
5. Васильева О.А., Якушина В.Д., Рязанцева Н.В. и др. Регуляция экспрессии генов транскрипционных факторов дифференцировки Т-лимфоцитов CD4⁺ галектином-3 in vitro // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 1004–1010.
6. Антонова С. С., Юшков П. В. Галектин-3 как представитель семейства лектинов: роль в норме и при патологии // Молекулярная медицина. – 2004. – № 1. – С. 60–64.
7. Stillman B.N., Hsu D. K, Pang M. et al. Galectin-3 and Galectin-1 Bind Distinct Cell Surface Glycoprotein Receptors to Induce T Cell Death // The Journal of Immunology. – 2006. – V. 176. – P. 778–789.
8. Green D.R., Evan G. I. A matter of life and death // Cancer Cell. – 2002. – N 1. – P. 19–30.
9. Katoh I., Tomimori Y., Ikawa Y., Kurata S. Dimerization and processing of procaspase-9 by redox stress in mitochondria // JBC. – 2004. – V. 279. – P. 15515–15523.
10. Bianchi C., Fato R., Angelin A. et al. Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and intact cells // Biophys Acta. – 2004. – V. 1656. – P. 139–147.
11. Wu G., Chai J., Suber T.L. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO // Nature. – 2000. – V. 408. – P. 1008–1012.
12. Joza N., Susin S. A., Daugas E. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death // Nature. – 2001. – V. 410. – P. 549–554.
13. Roucou X., Montessuit S., Antonsson B. et al. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein // Biochem. J. – 2002. – V. 368. – P. 915–921.
14. Cory S., Adams J.M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – V. 2. – P. 647–656.
15. Galluzzi L., Zamzami N., de La Motte Rouge T. et al. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis // Apoptosis. – 2007. – V. 12 (5). – P. 803–813.
16. Saveleva O.E., Litvinova L.S., Anishchenko E.S. et al. The role of transcription factors in cytokine-mediated apoptosis of lymphocytes // International Journal of Biology. – 2012. – V. 4 (1). – P. 129–137.
17. Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression // Immunol Res. – 2012. – P. 100–110.

Поступила 6.02.2015 г.