

“Маркеры” раннего апоптоза гемопоэтических клеток требуют включения программы криообновления: реальность и перспективы

Э.И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ, В.И. ГРИЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последние годы установлено, что часть живых клеток в том числе гемопоэтических при криоконсервировании повреждается и гибнет по типу апоптоза (В.И.Ващенко, 2000; В.И.Грищенко, Э.И.Алексеевская, В.И.Ващенко, 2001). Стволовые кроветворные клетки (СКК) являются неустойчивыми при замораживании и легко разрушаются на всех этапах криоконсервирования, особенно в зоне $-10-40^{\circ}\text{C}$ (А.Г.Фёдоров, 1981). Это сопровождается изменением направления дифференцировки и созревания. Может ли холод вызвать генетически детерминированные благоприятные изменения в криоконсервированных гемопоэтических клетках? В литературе эти вопросы почти не обсуждались. Вместе с тем актуальность их при современном состоянии экологии, возрастании заболеваний и смертности вполне очевидна. Осветить их, по всей вероятности, представляется возможным с позиции двух разнонаправленных феноменов апоптоза (программируемая гибель клетки) и криообновления (программируемая жизнь клетки).

Термин “апоптоз” (от греческого “apoptosis” – опадание) был введён Kerr J.F et al. в 1972 г. Апоптоз является одним из компенсаторных процессов, обеспечивающих гомеостаз внутренней среды организма. Служит для элиминирования не востребуемых, состарившихся, легко повреждающихся клеток. Гипо- и гиперфункции апоптоза ведут к нарушению гомеостаза гемопоэтических клеток. Запуск программы апоптоза – освобождение цитохрома С из митохондрий (E.Eldering, S.Hammamah, G.Nikolle et al., 1991; В.Д.Самуилов, 2000). Цитохром С, вышедший из митохондриального матрикса, активирует каспазы в митохондриях, в результате чего повреждается ядерная ДНК, а также катализирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) (X.Wang, R.K. Sharma, S.G. Sikka et al., 2003 и др.). В результате активации ПОЛ в клетке образуются активные формы кислорода (АФК), вызывающие повреждение мембран

В 1976 г. благоприятное стимулирующее действие цитохрома С в клетках криоконсервированного костного мозга мы обсудили на страницах журнала “Проблемы гематологии”. Представленные данные предопределили откры-

тие важнейшего феномена – криообновления, сравнимого лишь с апоптозом, являясь его противовесом. В 1984 году на страницах журнала “Гематология и трансфузиология” мы обосновали новые данные о селективном свойстве криоконсервирования, которые легли в основу создания концепции генетически детерминированных благоприятных изменений криоконсервированных биологических объектов (криообновление). В 1989 году мы обсудили ее на страницах журнала “Успехи современной биологии” (Т. 108. №2) и в главе атласа “Криоконсервированные клетки костного мозга и крови – качественно новая популяция”. Недавно концепция криообновления получила дальнейшее развитие на страницах вышеупомянутого журнала (2003, Т. 123, №5) и “Междунар. мед. журнала” (2004, №4), а также в совместных работах с российскими учёными (В.И.Грищенко, Э.И.Алексеевская, В.И.Ващенко и др., 2001).

Запуск программы криообновления – благоприятное стимулирующее действие цитохрома С, находящегося в тесной связи с антиоксидантами, которые уменьшают продукцию АФК и задерживают апоптоз. Важную роль в процессах криообновления играют цитокины. Они представляют собой обширную группу белков, которые регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток при связывании со специфическими рецепторами на клетках – мишенях. Цитокины объединены в 3 группы в зависимости от структуры и функции: 1) ростовые факторы (колониестимулирующие факторы, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста и др.); 2) семейство фактора некроза опухоли; 3) спиральные цитокины (интерлейкины, интерфероны). Процессы криообновления запускают ингибиторы каспаз и антиапоптотические сигналы. Кордовая кровь содержит набор специфических плацентарных белков, гормонов, ростовых факторов, цитокинов, гемопоэтических факторов, интерлейкинов и т. д., а также репродуктивных иммуномодуляторов, запускающих программу криообновления (А.К. Гулевский, В.И.Грищенко, А.М.Николенко, Н.М.Моисеева, 2004; М.Кvarnstron, М.Jenmalm., С.Ekerfelt, 2004 и др.). Антиапоптотические стимуляторы защищают нейтрофилы от стрессиндуцированного апоптоза путём активации гранулоцито-макрофагальных колониестимулирую-

Адрес для корреспонденции: Алексеевская Э.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

щих факторов (S.I.Gardai, B.B.Whitlok, Y.O. Xiao et al., 2004 и др.). Защита их происходит начиная от регистрации уменьшения мембранного потенциала и увеличения освобождения цитохрома С из митохондриальных мембран.

Поэтому на раннем этапе активации каспаз жизнь клетки ещё можно сохранить путём включения регуляторов, которые блокируют, или при необходимости усиливают разрушительное действие каспаз. К ним относятся белки Bcl-2 (ингибиторы апоптоза: AL, Bcl-2, Bcl W, Bcl-XL, Bcl-1, Ncl-1, NR13) и Bax (промоторы апоптоза): Nad, Bak, Nax, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). Bcr-Abl предотвращает апоптоз посредством ингибирования цитохрома С, вышедшего из мембран, а также тормозит активацию каспазы после освобождения цитохрома С. Установлен локус антиапоптотического действия Bcr-Abl, который тормозит активацию каспазы и высвобождение цитохрома С из мембран в лейкоэмических клетках путём микроинъектирования цитохрома С в интактные клетки (P.B. Deming, J.S. Schafer, M.B. Potts et al., 2004), что является преимуществом процессов криообновления. Показано, что экспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X была более выражена в CD34⁺ клетках, чем в мононуклеарных клетках (M. Xiao, D.S. Dooley, 2003). С позиции концепции криообновления перспективным является использование продуктов эмбриофеталоплацентарного комплекса и кордовой крови, являющихся богатым источником стволовых клеток и их предшественников, для лечения различных патологий (В.И.Грищенко, О.С.Прокопюк, 1997; А.Н. Гольцев, Т.А. Калиниченко, 1998; В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев, 2002 и др.). Например, препарат “Гемокорд” представляет собой суспензию кроветворных иммунокомпетентных, дендритных и других клеток в аутологической плазме (А.А. Цуцаева, В.И. Грищенко, О.В.Кудкоцева и др., 1999; А.А. Цуцаева, Т.А. Глушко, Н.П. Лобасенко и др., 2003). Противовирусное действие плазмы кордовой крови авторы объясняют присутствием в ней интерферона, который, как известно, является ингибитором апоптотических процессов и, следовательно, активатором процессов криообновления. Таким образом, использование продуктов эмбриофеталоплацентарного комплекса и кордовой крови позволяет сместить динамическое взаимодействие апоптоза и криообновления в сторону криообновления.

Известно, что L-селекция в CD34⁺ клетках играет важную роль в восстановлении гемопоэза после трансплантации стволовых клеток периферической крови. Показаны изменения L-селективной экспрессии в CD34⁺ клетках криоконсервированных трансплантатов (F. De Boer, A.M.Drager,

E. Van der Wall. et al, 2000). Выявлен различный уровень селекции в апоптотических и неапоптотических замороженно-оттаянных лимфоцитах и гранулоцитах.

Обработка цитокинами защищает от апоптоза криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови после их оттаивания (S. Sarkar, V.Kalia, R. Montelaro, 2003). Установлено участие каспаз-ингибитора z-VAD в криоконсервированно-индуцируемом апоптозе CD-4⁺ Т клеток, который способен тормозить как дезорганизацию митохондриальной мембраны, так и апоптоз. Лечение цитокинами IL-2, IL4, IL-7 и их комбинацией значительно ингибировало апоптоз - индуцированную гибель клетки и обеспечивало выживаемость CD-4⁺ Т-клеток в криоконсервированных мононуклеарных клетках периферической крови. Другие авторы предполагают, что каспаза 3 включилась в апоптоз предшественников CD34⁺ клеток кордовой крови коровы во время экспрессии *in vitro* и наиболее эффективный цитокинез SCF b FL мог сохранять гемопоэтические стволовые клетки и подавлять апоптоз (Y.P. Ma, P. Zou, M. Xiao, S.Huang, 2002). Исследование цитокинной секреции до и после замораживания гемопоэтических клеток позволит выработать тактику для каждого цитокина, способную затормозить развитие апоптотических процессов (M.Kvarnstron, M.Jenmalm, C.Ekerfelt, 2004).

Апоптоз в ответ на развивающийся раздражитель и стресс, стимулируемый каспазами, регулируется белковым семейством Bcl-2 (V.S. Marsden, P.G Ekert, D.M.Van et al, 2004). Лимфоциты чувствительны к различным апоптотическим стимуляторам. Снижение активности каспаз 2 и 9 лимфоцитов обусловлено сложным каспазозависимым апоптозом, включая освобождение цитохрома С из митохондрий. Замораживание-оттаивание мононуклеарных клеток костного мозга человека ведёт к повреждению белков, включённых в сигнализацию апоптотических клеток (J. Schmidt-Mende, E. Heldstrom-Lindberg, B. Jozebh, B. Zhivotovsky, 2000). Этот эффект полностью был заблокирован включением широкого спектра ингибиторов протеаз в среде замораживания и вследствие оттаивания клеток на льду. Вышеупомянутое хорошо демонстрирует процессы взаимодействия апоптоза и криообновления.

Недавно представлены обзорные работы функциональной и пространственной организации генов-холодовой адаптации (ХА) в геноме млекопитающих (Б. Фуллер, К. Грин, В.И.Грищенко, 2004) и человека (С.Р.Kloks, С.А..Spronk, E. Lasonder, 2002). Описана их локализация. Исследована структура области холодового шока (CSD)

УВ-1, которая ответственна за ДНК-связанные свойства белков. Выявлены индуцируемые ими белки холодового шока (ХШ), в частности, в лимфоцитах человека (А.А. Aldashev, К.А. Agibetov, А.А. Yugai, А.Т. Shamshiev, 1991). Показаны экспрессия гена как результат окислительного стресса (Y.H. Kim, S. Lim, J.H. Lee et al., 2003) и необходимость использования антиоксидантов как блокаторов апоптотических реакций. Не менее важным в реализации механизмов криообновления является экспрессия таких антиапоптотических генов в клетках крови человека, как Al, Mcl, Rho A и hHR23B (M.M. Heeney, S.M. Ormsbee, M.A. Moody et al., 2003). Они могут вызвать устойчивость к апоптозу у больных судорожной почечной гемоглобинурией и обеспечить общий компенсаторный механизм после повреждения клеток костного мозга, что способствует выживанию и росту оставшихся гемопоэтических стволовых клеток.

Разработка оптимальных методов криоконсервирования гемопоэтических клеток и эффективности клеточной терапии теснейшим образом связана с использованием “маркеров” раннего апоптоза. Один из них – определение активности фосфатидилсерина (антиоксиданта) с помощью annexin Y-связывания и хемилюминесценции (O. Augereau, R. Rossignol, F. DeGiorgi et al., 2004). Признаки раннего апоптоза регистрируются в том случае, когда фосфатидилсерин переходит из внутреннего монослоя плазматической мембраны в её наружный монослой (D.Y. Gao, K. Neff, H.Y. Xiao, 1999). Эти данные наглядно демонстрируют процессы апоптоза, которые вытесняют реакции криообновления. Поэтому своевременное введение в гемопоэтические клетки антиапоптотических белков и антиоксидантов позволит затормозить процессы апоптоза на ранних этапах. После замораживания-оттаивания клеток кордовой крови лучшим способом обнаружения раннего апоптоза СКК считают витальное окрашивание SytoR16, annexin Y, 7-AAD (7 aminoactinomycin), комбинацию SytoR16 и 7-AAD, G.J. Schuurhuis, M.M. Muijen, J.W. Obering et al., 2001; M. Xiao, D.C. Dooley, 2003). Трипановым синим ранний апоптоз не обнаружен.

Наиболее существенным “маркером” раннего апоптоза, помимо вышеупомянутых, является потеря митохондриальными мембранами цитохрома С. Освобождённый цитохром С индуцирует процессы программируемой гибели криоконсервированных гемопоэтических клеток, что может привести к развитию непредсказуемых последствий после использования их в лечебной практике. Использование антиапоптотических белков, способных тормозить выход цитохрома С из митохондриального матрикса, либо уничтожить

его в цитозоле, что существенно повысит лечебную эффективность гемопоэтических клеток, в том числе СКК.

Таким образом, выявление раннего апоптоза позволит своевременно включить программу криообновления путём экспрессии генов ХА и индукции белков ХШ. Сдвинуть динамическое взаимодействие апоптоза и криообновления в сторону криообновления возможно с помощью антиапоптотических белков, антиоксидантной системы, а также ингибиторов апоптоза, цитокинов, гормонов, ростовых факторов, интерлейкинов, интерферонов. Аналогичное действие оказывают репродуктивные иммуномодуляторы, продукты эмбриофетоплацентарного комплекса и кордовой крови, выступающие в роли ингибиторов апоптоза и, следовательно, активаторов криообновления.

В настоящее время зарубежные учёные при разработке лекарственных средств используют принципы программируемой жизни клетки (J.C. Reed, 1997). В этой связи они применяют антиапоптотические белки и цитохром С для лечения лейкемии (M.C. Legdeur, P.M. Bontje, G.J. Ossenkoppele et al., 1996; W.B. Zhong, C.Y. Wang, K.J. Ho et al., 2003 и др.), наследственных болезней (E.M. Degli, 2004), мужского бесплодия (N. Sugiyama, M. Obinata, Y. Matsui, 2001; X. Wang, R.K. Sharma, P. Ranganathan et al., 2001; X. Wang, R.K. Sharma, S.G. Sikka et al., 2003 и др.) и других заболеваний. В 2004 году на страницах “Международного медицинского журнала” мы представили на обсуждение теоретическое обоснование эффективности использования цитохрома С в медицинской практике с позиции двух разнонаправленных процессов – апоптоза и криообновления.