

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD38 И МЕТАБОЛИЗМА НАД⁺ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА

А. Б. Салмина, Ю. А. Успенская, С. В. Михуткина, Р. Я. Оловяникова, Л. А. Кушнир¹

Исследованы клеточные механизмы миелотоксического действия доксорубина, ассоциированные с нарушением экспрессии и функциональной активности НАД⁺-гликогидролазы/CD38. Установлено, что острое и подострое воздействие ксенобиотика приводит к снижению экспрессии CD38 в клетках костного мозга мышей. При этом уровень внутри- и внеклеточного НАД⁺ увеличивается, что сопровождается повышением чувствительности клеток к апоптогенному действию доксорубина. Обсуждается возможная роль НАД⁺-гликогидролазы/CD38 в регуляции чувствительности клеток к токсическому действию ксенобиотика.

Ключевые слова: доксорубин, CD38, НАД⁺, окислительный стресс, апоптоз

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоцитарный антиген CD38 является бифункциональным ферментом, сочетающим АДФ-рибозилциклазную и цАДФ-рибозилгидролазную активность (ЕС 3.2.2.5, ЕС 3.2.2.6), с выраженной экспрессией на клеточных мембранах, соответствующей степени их дифференцировки и пролиферации. CD38 обнаружен на костномозговых стволовых клетках, зрелых и незрелых Т-лимфоцитах, естественных киллерах, макрофагах, гранулоцитах, нейтрофилах и тромбоцитах, а также тимоцитах и клетках тканей с высокой глюкозо-утилизирующей способностью (поджелудочная железа, печень, почки, мозг) [5, 15]. Продукт ферментативной активности CD38 — циклическая АДФ-рибоза (цАДФР) является универсальным мобилизатором кальция из внутриклеточных депо [7]. Кальциевая сигнализация, опосредованная цАДФР, была зарегистрирована в тканях и клетках различных организмов [6].

Весьма значительна роль CD38 в регуляции функциональной активности клеток костного мозга, лимфоидной ткани и периферической крови млекопитающих: эта молекула выполняет роль рецептора В-лимфоцитов, взаимодействует с CD31 эндотелиальных клеток, стимулирует продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови, регулирует активность фагоцитирующих клеток, участвует в регуляции апоптоза лимфоцитов, в процессах миграции дендритных клеток [5, 11, 12]. Вместе с тем костный мозг, полученный от CD38^{-/-} мышей, сохраняет нормальную способность к обновлению популяции [5].

Регуляция метаболизма НАД⁺ в клетках является одним из обязательных условий для реализации биологических эффектов многих эндогенных регуляторов и экзо-

генных факторов, что связано не только с известной коферментной функцией этой молекулы, но и с ее функционированием в качестве субстрата для ряда внутриклеточных ферментов [10]. Известно, что изменение гомеостаза НАД⁺ является важным компонентом цитотоксичности ксенобиотиков, это связывают с активностью НАД⁺-утилизирующих ферментов, прежде всего полиАДФР-полимеразы, приводящей к истощению внутриклеточного НАД⁺ [8]. Однако практически не изученным остается вопрос о роли НАД⁺-гликогидролазы/CD38 или продуктов его ферментативной активности в регуляции метаболизма НАД⁺ в клетках в условиях токсического действия ксенобиотиков.

Целью работы явилось изучение особенностей экспрессии CD38 в клетках костного мозга мышей при действии миелотоксического ксенобиотика доксорубина *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на белых беспородных мышцах-самцах массой 20 – 25 г ($n = 50$), с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Выделение клеток костного мозга проводили по стандартной методике [2].

Детекцию экспрессии CD38 на клетках костного мозга проводили с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием моноклональных антител к CD38 (“Caltag Laboratories”, США) по стандартной методике.

Детекцию запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) проводили путем идентификации экспрессии фосфатидилсерина на наружной стороне цитоплазматической мембраны методом регистрации связывания FITC-меченого аннексина V (Annexin V Apoptosis Detection Kit, “Caltag Laboratories”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Идентифицировали четыре популяции клеток: жизнеспособные, находящиеся на ранней стадии апоптоза, находящиеся в состоянии вторичного некроза и собственно некротические клетки.

Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии клеток костного мозга проводили путем измерения содержания малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по стандартной методике, включающей инкубацию исследуемой пробы с ТБК, экстрак-

¹ Кафедра биохимии с курсом медицинской химии; межкафедральная биохимическая научно-исследовательская лаборатория (зав. — проф. А. Б. Салмина) Красноярской государственной медицинской академии, Красноярск, 660022, ул. П. Железняк, 1.

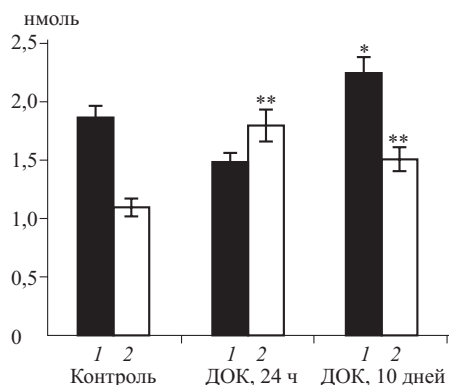


Рис. 1. Концентрация НАД⁺ в клетках костного мозга и во внеклеточном пространстве при остром и подостром введении доксорубина (ДОК) *in vivo*.

1 — внутриклеточное содержание, 2 — внеклеточное содержание. Здесь и на рис. 2 отличия достоверны при сравнении с контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,02$.

цию продуктов реакции бутанолом и спектрофотометрическое измерение их содержания.

Определение концентрации внутри- и внеклеточного НАД⁺ проводили спектрофотометрически с использованием алкогольдегидрогеназы по методу В. С. Асатиани [1].

Исследование влияния доксорубина (“Ферейн”, Россия) на клетки костного мозга *in vivo* проводили при остром однократном введении мышам в максимально переносимой дозе (6 мг/кг) внутривенно в физиологическом растворе, а также подостром внутривенным введением в дозе 1/10 ЛД₅₀ (0,95 мг/кг) в течение 10 дней с интервалом 24 ч.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Костный мозг интактных мышей демонстрировал экспрессию CD38 в $19,29 \pm 1,74$ % клеток, преимущественно лимфоидного ряда. Экспрессия была зарегистрирована только в плазматической мембране клеток. Воздействие доксорубина *in vivo* в течение 1 и 10 сут значительно изменяло экспрессию CD38 на клетках костного мозга. Так, через 24 ч после введения ксенобиотика количество CD38⁺ клеток костного мозга снизилось до $14,43 \pm 1,22$ % ($p < 0,05$), а к 10 суткам введения — до $5,8 \pm 0,65$ % ($p < 0,001$).

Следовало ожидать, что нарушение экспрессии CD38 может сопровождаться значимыми изменениями метаболизма НАД⁺ в гемопоэтических клетках. Действительно, острое и подострое введение доксорубина мышам *in vivo* привело к изменению внутри- и внеклеточного содержания НАД⁺ в клетках костного мозга мышей. Так, через 24 ч после однократного введения ксенобиотика уровень НАД⁺ внутри клеток достоверно не изменился, тогда как во внеклеточной среде его концентрация повысилась по сравнению с исходным значением (рис. 1). Известно, что действие цитотоксических ксенобиотиков приводит к значительному снижению уровня НАД⁺ в клетках в связи с активацией полиАДФ-рибозилполимеразы, участвующей в обеспечении процессов репарации ДНК [8], однако это происходит лишь в первые часы после токсического воздействия. Поэтому отсутствие изменения внутриклеточной концентрации НАД⁺ через 24 ч

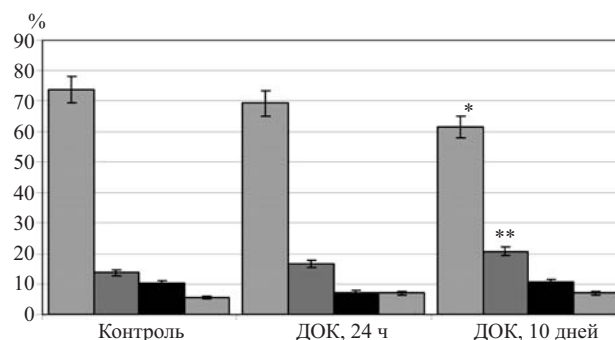


Рис. 2. Влияние доксорубина (ДОК) на развитие запрограммированной клеточной гибели в клетках костного мозга при остром и подостром введении *in vivo*.

1 — живые, 2 — апоптоз, 3 — вторичный некроз, 4 — некроз. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

после действия доксорубина на клетки костного мозга объясняется достаточным временем для регенерации НАД⁺. Вместе с тем повышение концентрации НАД⁺ во внеклеточном пространстве могло бы быть связано с высвобождением НАД⁺ из погибших клеток, однако доксорубин не проявлял некрозогенной активности ни в течение одних суток, ни к 10-му дню воздействия, следовательно, реализация такого эффекта имеет иной механизм.

К 10 суткам подострого воздействия доксорубина уровень внутриклеточного и внеклеточного НАД⁺ в костном мозге достоверно увеличился (рис. 1). Это соответствовало снижению экспрессии CD38 в клетках костного мозга, приводящему к уменьшению его суммарной ферментативной активности. Предполагают, что CD38 может играть роль сенсора НАД⁺ в клетках: при насыщающем количестве внутриклеточного НАД⁺ CD38 начинает функционировать в комплексе с мембранным транспортером НАД⁺ и обеспечивает транслокацию НАД⁺ во внеклеточное пространство [14]. Таким образом, снижение НАД⁺-конвертирующей активности CD38 и реализация механизма высвобождения НАД⁺ во внеклеточную среду могут приводить к значительным изменениям внутри- и внеклеточного метаболизма НАД⁺ в костном мозге при действии цитотоксического агента.

Коль скоро уровень внутриклеточного НАД⁺ регулирует чувствительность клеток к действию индукторов апоптоза [13], мы исследовали развитие запрограммированной клеточной гибели в клетках костного мозга, подвергнутых острому и подострому действию доксорубина. Острое введение доксорубина мышам *in vivo* не оказывало апоптоз-индуцирующего эффекта, однако в клетках, подвергнутых 10-дневному воздействию ксенобиотика, было обнаружено увеличение количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза (клетки с экстернализированным фосфатидилсеринем), и, соответственно, уменьшение количества жизнеспособных клеток (рис. 2). Таким образом, снижение экспрессии CD38 в клетках костного мозга под действием доксорубина сопровождалось повышением их чувствительности к апоптоз-индуцирующему действию ксенобиотика на фоне возрастания уровня внутриклеточного НАД⁺, что подтверждает существующие предположения о необхо-

димости поддержания адекватного уровня НАД⁺ в клетках для реализации программы апоптоза. Кроме того, существуют экспериментальные данные, что инактивация CD38 за счет реакций АДФ-рибозилирования приводит к индукции апоптоза активированных Т-лимфоцитов [7].

Механизмы цитотоксического действия доxorубина связывают с индукцией окислительного стресса, повреждением клеточных мембран, подавлением репликации и транскрипции [3, 9], индукцией апоптоза [4]. Признавая ключевую роль митохондриальной дисфункции в развитии апоптоза, а также с учетом известного механизма цитотоксического действия доxorубина, связанного с нарушением работы дыхательной цепи митохондрий [16], мы оценили выраженность окислительного стресса в клетках костного мозга как маркера повреждения митохондриальной электрон-транспортной цепи. Введение ксенобиотика *in vivo* увеличивало продукцию МДА в клетках костного мозга к 24-му часу до $12,92 \pm 0,56$ мкмоль/л ($p < 0,001$) с последующим снижением до $4,97 \pm 0,94$ мкмоль/л ($p < 0,05$) после 10 суток введения доxorубина. Экспериментальные данные [17] свидетельствуют о том, что CD38 может выполнять функцию редокс-сенсора в клетках: повышение уровня внутриклеточного НАДН приводит к снижению активности цикло-АДФ-гидролазы, аккумуляции цАДФ, усилению ее биологических эффектов. Следовательно, логично предположить, что активность доxorубина в качестве альтернативного акцептора электронов от комплекса I [16] и связанное с этим нарушение активности электрон-транспортной системы митохондрий приводит к уменьшению соотношения НАД⁺/НАДН в клетках костного мозга и изменению ферментативной активности НАД⁺-гликогидролазы. Результатом этого может являться нарушение биологического действия эндогенных регуляторов функциональной активности клеток, реализующих свои эффекты за счет метаболических путей, связанных с продукцией циклической АДФ-рибозы в качестве вторичного посредника, в силу чего чувствительность клеток к апоптогенному эффекту ксенобиотика изменяется.

ВЫВОД

Доксорубин, являясь индуктором окислительного стресса и митохондриальной дисфункции, реализует ми-

елотоксическое действие, в числе прочих механизмов, за счет снижения экспрессии CD38, нарушения метаболизма НАД⁺ и связанного с этим изменения чувствительности клеток костного мозга к действию апоптогенных стимулов *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Асатиани, *Ферментные методы анализа*, Наука, Москва (1969).
2. Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов, *Методы культуры тканей в гематологии*, Изд-во Томского университета, Томск (1992).
3. Е. Д. Гольдберг, В. В. Новицкий, *Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови*, Изд-во Томского университета, Томск (1986).
4. V. N. Bilim, Y. Tomita, T. Kawasaki, et al., *Apoptosis*, **2**, 207 – 213 (1997).
5. D. A. Cockayne, T. Muchamuel, J. C. Grimaldi, et al., *Blood*, **92**(4), 1324 – 1333 (1998).
6. L. Franco, E. Zocchi, C. Usai, et al., *Biol. Chem.*, **276**(24), 21642 – 21648 (2001).
7. M.-K. Han, Y.-S. Cho, Y. S. Kim, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**(27), 20799 – 20805 (2000).
8. H. Higashida, J. Robbins, A. Egorova, et al., *J. Physiol.*, **482**(2), 317 – 323 (1995).
9. R. Jeyselan, C. Poizat, H.-Y. Wu, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(9), 5828 – 5832 (1997).
10. G. Magni, A. Amici, M. Emanuelli, et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 19 – 34 (2004).
11. F. Malavasi, A. Funaro, S. Roggero, et al., *Immunol. Today*, **15**(3), 95 – 97 (1994).
12. S. Partida-Sanchez, S. Goodrich, K. Kusser, et al., *Immunity*, **20**, 279 – 291 (2004).
13. Z.-H. Ran, B. Rayet, J. Rommelaere, and S. Faisst, *Virus Res.*, **65**, 161 – 174 (1999).
14. L. Sun, O. A. Adebajo, A. Koval, et al., *FASEB J.*, **16**, 302 – 314 (2002).
15. F. Tajima, T. Deguchi, J. H. Laver, et al., *Blood*, **97**(9), 2618 – 2624 (2001).
16. K. B. Wallace and A. A. Starkov, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 353 – 388 (2000).
17. H. L. Wilson, M. Dipp, J. M. Thomas, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**(14), 11180 – 11188 (2001).
18. M. Ziegler, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1550 – 1564, (2000).

Поступила 13.05.05

ALTERATION OF CD38 EXPRESSION AND NAD⁺ METABOLISM INDUCED BY DOXORUBICIN IN BONE MARROW CELLS

A. B. Salmina, Yu. A. Uspenskaya, S. V. Mikhutkina, R. Ya. Olovyanikova, and L. A. Kushnir

Krasnoyarsk State Medical Academy, P. Zheleznyaka, 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

Mechanisms of myelotoxic action of Doxorubicin associated with changes in NAD⁺-glycohydrolase/CD38 expression and activity have been assessed. During the acute and subacute exposure of bone marrow cells to Doxorubicin *in vivo*, expression of CD38 is decreased corresponding to elevation of intracellular and extracellular NAD⁺ concentrations. These changes are associated with increased susceptibility of hemopoietic cells to the apoptogenic action of Doxorubicin. Possible role of NAD⁺-glycohydrolase/CD38 in the regulation of sensitivity of the cells to the cytotoxic effects of the xenobiotic is discussed.