

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ПОДДЕРЖАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА

Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Белевич Е.И., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: tayzoe@mail.ru
Поступила в редакцию: 14.10.2019

Аннотация. Проведена оценка уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов и активности цистеиновой протеазы – каспазы-3 в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом до и после модификации их редокс-статуса. При физиологических условиях в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкемических клетках приводил к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому механизму. Установлено, что основным триггером в этом процессе могут выступать металлотионеины, как полипептиды, способные депонировать ионы цинка, и тем самым играть значительную роль в процессах, опосредованных цинковой сигнализацией, в лимфоцитах человека при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

Ключевые слова: хронический В-лимфоцитарный лейкоз, металлотионеины, каспаза-3, окислительно-восстановительный баланс, цинковый гомеостаз.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из предполагаемых путей развития устойчивости опухолевых клеток к действию ксенобиотиков является увеличение содержания внутриклеточных тиолов, таких как глутатион и металлотионеины (MTs), которые связывают компоненты, токсичные для клетки. MTs млекопитающих представляют собой суперсемейство незнзиматических полипептидов (молекулярная масса 6-7 кДа) с высоким содержанием цистеина, серы и металлов (тиолатные кластеры металлов). Именно благодаря своей уникальной структуре данные белки способны связывать (депонировать) ионы металлов (при физиологических условиях преимущественно Zn²⁺ [1]), а также инактивировать активные формы кислорода (АФК). Это свойство используется во многих реакциях и, таким образом, MTs могут выполнять важные функции в различных биохимических сигнальных каскадах [2]. На сегодняшний день не вызывает сомнения защитная роль MTs от процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза) [2–4]. В работе [3] обнаружена повышенное содержание MTs в опухолевых клетках по периферии очага, что связано с высоким уровнем клеточной пролиферации. Такая экспрессия MTs в строме опухоли связана с её разрастанием, поскольку именно строма отвечает за рост опухоли и её агрессивность. Авторы сделали вывод, что строма злокачественной опухоли с высоким уровнем MTs защищает себя от апоптоза. При воздействии клинически значимых концентраций доксорубина (DOX) на первичную культуру кардиомиоцитов, полученную из сердечной мышцы трансгенных новорожденных мышей со сверхэкспрессией MTs, а также на культуру кардиомиоцитов от нетрансгенных животных (контроль), был выявлен высокий уровень апоптотических клеток в контроле, в то же время процессы апоптоза значительно подавлялись в трансгенных кардиомиоцитах. При этом в контрольных кардиомиоцитах наблюдался выход цитохрома *c* из митохондрий и активация каспазы-3 на фоне значительного содержания в них АФК [4]. Воздействие DOX активировало p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), участие которой является критически важным для запуска процесса апоптоза. MTs ингибировали DOX-активированную p38 MAPK, при этом антиапоптотический эффект был намного более выраженным, чем в случае обработки кардиомиоцитов специфическим ингибитором p38 MAPK – SB203580 [5]. Авторы предположили, что MTs ингибируют не только p38 MAPK-опосредованный путь, но и другие сигнальные каскады процесса апоптоза, запускаемые в ответ на DOX-индуцированный окислительный стресс [4]. Один из таких путей включает в себя активацию каспазы-3, которая происходит при выходе цитохрома *c* из митохондрий в ответ на окислительный стресс [6]. Выход цитохрома *c* в цитозоль приводит к формированию сложного комплекса (апоптосомы), состоящего из молекул цитохрома *c*, Araf-1 (dATP-dependent apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазы-9, в котором неактивная прокаспаза-9 превращается в активную каспазу-9. Далее каспаза-9 протеолитически расщепляет прокаспазу-3 до активной каспазы-3 [7]. Последующее развитие процесса апоптоза связано с опосредованным каспазой-3 расщеплением белков ядерной ламины и цитоскелета клетки. Таким образом, как MTs, так и каспаза-3 способны участвовать в запуске апоптотического процесса в патологических клетках.

Целью данной работы явилось выяснение роли металлотионеинов в инициации процессов апоптоза в лимфоцитах пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом при модификации их окислительно-восстановительного баланса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров ($n = 6$), полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ и пациентов с диагнозом хронический В-лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ, $n = 8$), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница». Все образцы крови были в консерванте "гепарин".

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) изолировали в градиенте гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300g, 30 мин) и отмывок в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,4 (PBS). После выделения клетки помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мМ L-глутамина. Клетки инкубировали в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 при температуре 37°C в течение 24 ч с агентами, модифицирующими окислительно-восстановительный баланс: N-ацетилцистеином (НАС, 200 мкМ), хлоридом цинка (ZnCl_2 , 50 мкМ) и после краткосрочного воздействия (15 мин) пероксида водорода (H_2O_2 , 100 мкМ).

Для оценки содержания МТs I/II типов ПМНК фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (60 мин, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$), отмывали путем центрифугирования (300g, 15 мин) и проводили пермеабиллизацию мембран 0,5%-м раствором детергента твин 20 в PBS буфере (10 мин, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$). Далее проводили последовательную инкубацию клеток с первичными мышинными моноклональными антителами против металлотioneинов UC1MT (12 ч, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$) и с вторичными поликлональными козлиными антителами, конъюгированными с FITC, против мышинового IgG1 (2 ч, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$). В качестве изотипического контроля использовали мышинные моноклональные антитела, конъюгированные с FITC, против IgG1, которые параллельно инкубировали с исследуемыми клетками при вышеописанных условиях. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FL1-H канале и по отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC к интенсивности флуоресценции изотипического контроля (IgG1-FITC) судили о степени экспрессии металлотioneинов в исследуемых клетках.

О жизнеспособности периферических лимфоцитов судили по степени активности каспазы-3 с помощью набора реагентов CaspGlowTM по стандартному протоколу производителя. Для этого суспензию ПМНК инкубировали с нетоксичным ингибитором каспазы-3 (FITC-DEVD-FMK) в 10 мМ HEPES-буфере pH 7,4 (60 мин, $t = 37^\circ\text{C}$), который способен проникать в клетки и необратимо связываться с активированной каспазой-3. Измерения интенсивности флуоресценции образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FL1-H канале. Апоптотическими (нежизнеспособными) считали клетки, окрашенные флуоресцентным субстратом FITC-DEVD-FMK.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Вилкоксона и Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что эффекторная каспаза-3 относится к семейству цистеиновых аспартат-зависимых протеаз, которые в норме представлены в виде неактивных предшественников – прокаспазы-3 с молекулярным весом 32 кДа. Она способна активироваться в результате действия двух основных сигнальных путей апоптоза: рецептор-зависимого (внешнего) и митохондриального (внутреннего). После активации каспаза-3 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой соответственно 17 и 12 кДа, в функции которого входит прямое и опосредованное разрушение клеточных структур [8].

На рисунке 1 представлены репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции ингибитора каспазы 3 FITC-DEVD-FMK в лимфоцитах пациента с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом. Как видно из рисунка, содержание интактных клеток в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ, не окрашенных ингибитором для каспазы 3 (жизнеспособных клеток), составило в среднем 75-85%, т.е. 15-25% интактных клеток находилось в стадии апоптоза (рис. 2). Стоит отметить, что для лимфоцитов доноров данный параметр составил в среднем 5-10% (данные не представлены), что указывает на повышенную чувствительность клеток пациентов с В-ХЛЛ к развитию процессов спонтанного апоптоза при физиологических условиях *in vitro*.

Известно, что ионы цинка участвуют в защите биологических структур от окислительного стресса путем поддержания определенного уровня глутатиона и количества металлотioneинов, взаимодействуя с ионами других переходных металлов и т.д. [9]. С другой стороны, при увеличении внутриклеточной лабильной концентрации Zn^{2+} на 50 нМ данный микроэлемент проявляет прооксидантные свойства [10, 11]. Соответственно, содержание ионов цинка в клетке тесно связано с ее окислительно-восстановительным балансом, а ответ клетки контролируется преимущественно внутриклеточным "лабильным" пулом ионов цинка. Нами установлено, что инкубация *in vitro* лимфоцитов пациентов при В-ХЛЛ с хлоридом цинка в концентрации 50 мкг/мл в течение 24 ч приводила к незначительному снижению количества жизнеспособных клеток в среднем на 5-10% по сравнению с интактными клетками (контроль), однако данные статистически не достоверны (рис. 2).

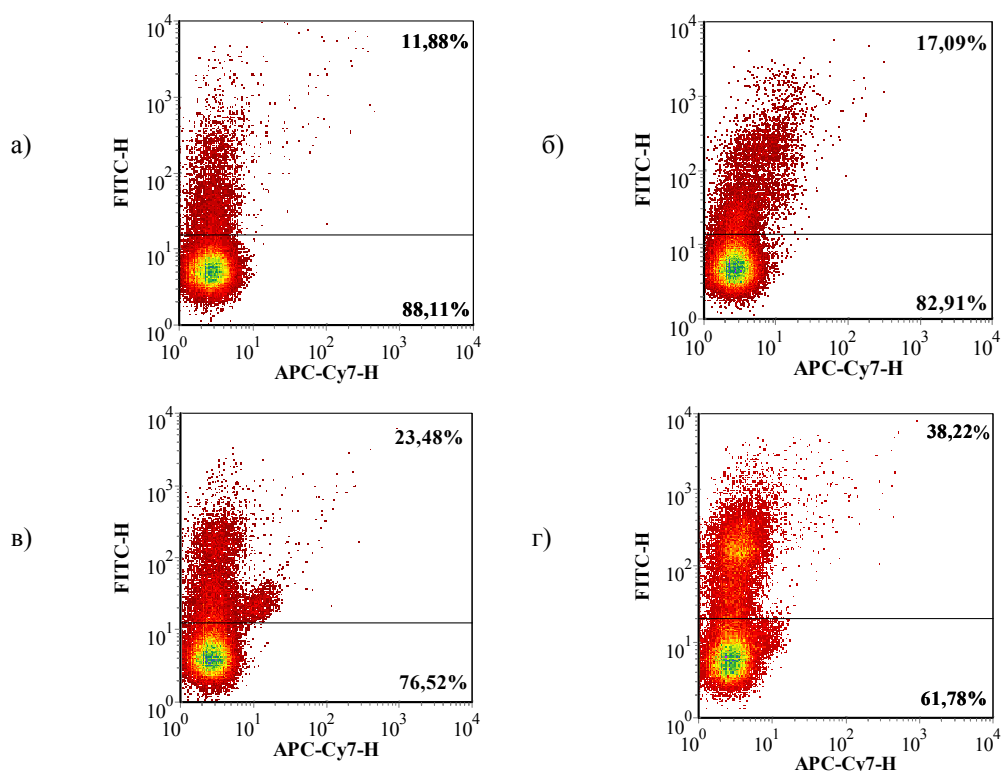


Рисунок 1. Репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции субстрата каспазы 3 FITC-DEVD-FMK в лимфоцитах пациента с В-ХЛЛ а – диаграмма распределения интенсивности флуоресценции FITC-DEVD-FMK в интактных лимфоцитах пациента с В-ХЛЛ (контроль); б – после воздействия $ZnCl_2$ (50 мкг/мл); в – после воздействия NAC (200 мкМ); г – после воздействия H_2O_2 (100 мкМ); (по оси ординат – интенсивность флуоресценции FITC-DEVD-FMK в усл. ед.)

Для модификации редокс-баланса в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ был использован пероксид водорода в качестве оксиданта. Известно, что при воздействии на клетки H_2O_2 окислительные процессы в них начинаются незамедлительно после его добавления *in vitro* и быстро достигают плато в отличие от эффектов, индуцированных трет-бутилгидропероксидом, которые развиваются медленно и усиливаются со временем. В качестве антиоксиданта был использован N-ацетилцистеин (NAC), который является одним из предшественников GSH. Он способен достаточно быстро накапливаться в клетках и деацетилироваться до цистеина, что приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации GSH [12, 13].

Таким образом, установлено, что модификация редокс-баланса в лейкозных клетках с помощью NAC и H_2O_2 приводила к снижению процентного содержания жизнеспособных клеток в суммарной популяции лимфоцитов при В-ХЛЛ соответственно в среднем на 10-15% и 20-25% по сравнению с контролем, причем для H_2O_2 полученные результаты статистически достоверны (рис. 2).

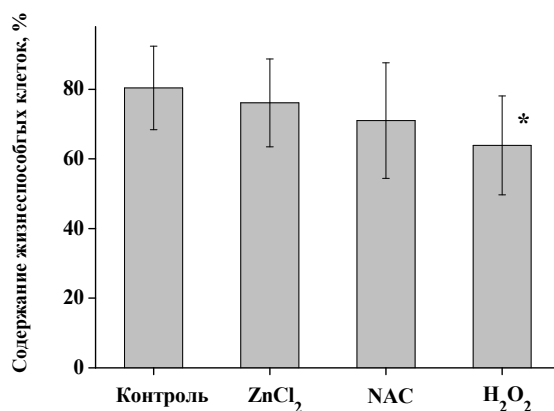


Рисунок 2. Процентное содержание лейкозных клеток, не связавшихся с флуоресцирующим ингибитором каспазы 3 – FITC-DEVD-FMK, после воздействия $ZnCl_2$, NAC и H_2O_2 *in vitro*. За контроль приняты интактные клетки, в среде инкубации которых отсутствовали $ZnCl_2$, NAC и H_2O_2 ;

* - различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Параллельно была проведена оценка содержания цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ.

На рисунке 3 представлены репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции комплексов UC1MT-IgG1-FITC и IgG1-FITC (изотипический контроль к UC1MT) в лимфоцитах доноров (рис. 3 А, Б) и пациентов с В-ХЛЛ (рис. 3 В, Г). Известно, что UC1MT – это специфические моноклональные антитела к двум классам МТs – МТ I и МТ II. По отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC [$I_{\text{фл}}(\text{МкАТ})$] к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC [$I_{\text{фл}}(\text{из. к})$], характеризующему неспецифическое связывание антител, можно судить об относительном содержании МТs в исследуемых клетках. Проведенная серия экспериментов показала, что в лимфоцитах доноров данный показатель в среднем составил $15,3 \pm 3,9$. В то время как в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ содержание МТs было снижено в среднем в 2 раза и составило $8,9 \pm 1,7$.

В свою очередь, при изменении цинкового гомеостаза лейкозных клеток (при инкубации с хлоридом цинка в концентрации 50 мкг/мл в течение 24 ч) происходит статистически достоверное увеличение содержания металлотионеинов в среднем в 2,5-3,1 раза по сравнению с интактными клетками, в среде инкубации которых отсутствовал хлорид цинка (рис. 4). Полученный результат указывает на значительную роль металлотионеинов в качестве внутриклеточных депо при поддержании гомеостаза ионов цинка в лимфоцитах с В-ХЛЛ.

Смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону антиоксидантов с помощью НАС не вызывало изменения в содержании металлотионеинов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ по сравнению с интактными клетками (рис. 4). В то же время H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс приводил к статистически достоверному снижению уровня металлотионеинов в лейкозных клетках в среднем на 20-25% по сравнению с контролем (рис. 4).

Более того, проведенный корреляционный анализ между содержанием металлотионеинов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия H_2O_2 и количеством жизнеспособных клеток (не окрашенных ингибитором каспазы-3) установил статистически значимую обратную зависимость ($R_s = -0,89$; $p = 0,016$). Данный факт указывает на участие металлотионеинов в запуске апоптотических процессов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ при H_2O_2 -индуцированном окислительном стрессе. Этот результат хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о сниженной чувствительности лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ к воздействию H_2O_2 по сравнению с нормальными клетками [14], т.к. в иммунных клетках здоровых доноров содержание МТs в среднем в 2 раза выше, чем в лейкозных лимфоцитах (рис. 3).

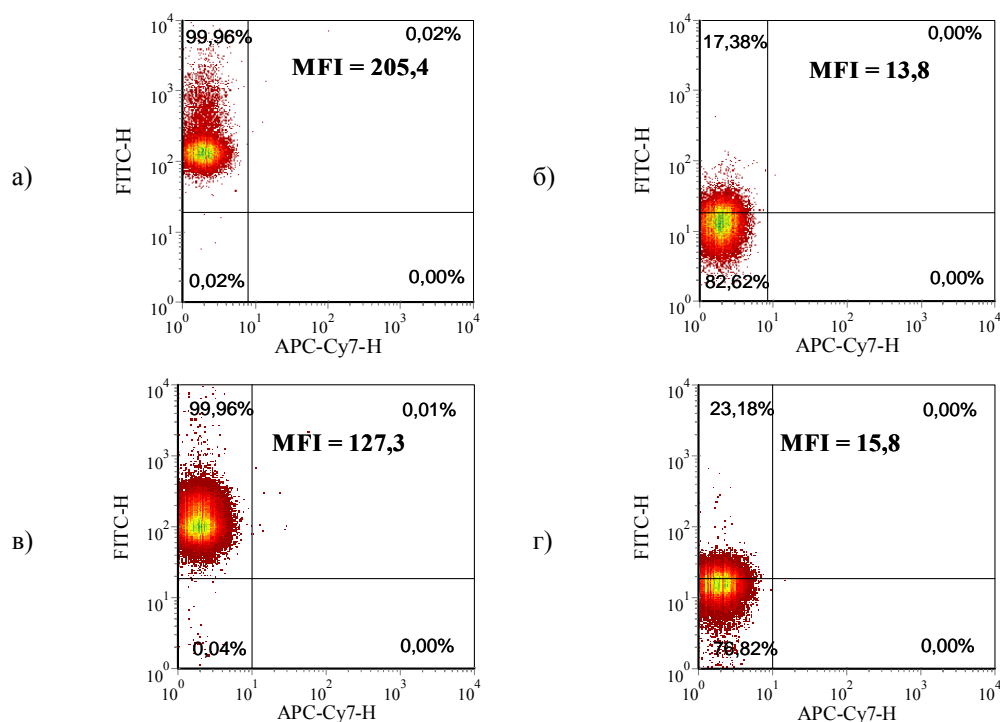


Рисунок 3. Репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC и IgG1-FITC в лимфоцитах доноров и пациентов с В-ХЛЛ. а – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC в лимфоцитах доноров; б – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-FITC в лимфоцитах доноров; в – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ; г – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-FITC в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ; по оси ординат – интенсивность флуоресценции лимфоцитов в усл. ед.

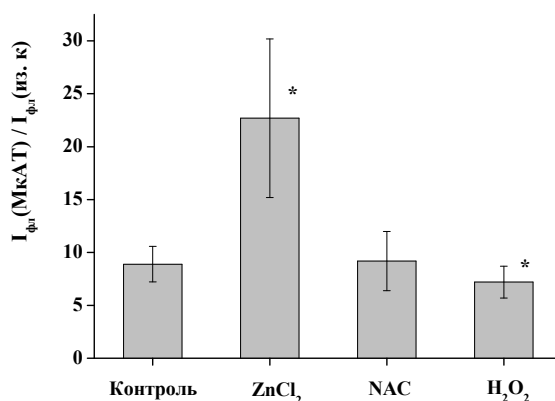


Рисунок 4. Экспрессия металлотионеинов I/II изоформ в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ после воздействия ZnCl₂, NAC и H₂O₂. I_{Фл} (МкАТ) – интенсивность флуоресценции вторичных антител IgG1-FITC, связавшихся со специфическими моноклональными антителами UC1MT против металлотионеинов I и II изоформы; I_{Фл} (из. к) – интенсивность флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC; * – различия по сравнению с контролем (интактными лимфоцитами) достоверны (p < 0,05)

Установленный факт можно объяснить тем, что МТs, как внутриклеточные цистеин-содержащие белки, депонирующие эссенциальные микроэлементы (ионы цинка и меди), способны окисляться конститутивными, мягкими проокислительными факторами, такими как окислительный глутатион или соединения селена [15, 16]. Этот процесс приводит к немедленному высвобождению ионов цинка в цитозоль, что вызывает локальное увеличение его концентрации. Повышенная концентрация лабильных ионов цинка в клетке может привести к диссипации митохондриального трансмембранного потенциала [17, 18], влекущее за собой снижение продукции АТФ [19] и, соответственно, накопление АФК [20], что, в конечном счете, вызовет гибель клеток. Полученный результат указывает на способность цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза ионов цинка в лейкозных клетках [21, 22], выступать одним из триггеров в процессе инициации апоптоза в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ по каспазо-зависимому пути при H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при физиологических условиях в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкоэмических клетках приводил к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому механизму. А одним из основных триггеров в этом процессе могут выступать металлотионеины, как полипептиды, способные депонировать ионы цинка, и тем самым играть значительную роль в процессах, опосредованных цинковой сигнализацией, в лимфоцитах человека при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

Список литературы / References:

1. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.*, 2003, vol. 533, no. 1-2. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014.
2. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слободжанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2016, № 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian methalothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116 (In Russ)]
3. Dutsch-Wicherek M., Sikora J., Tomaszewska R. The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Frontiers in Bioscience*, 2008, no. 13. DOI: 10.2741/2991.
4. Wang G.W., Klein J.B., Kang Y.J. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, vol. 298, no. 2, pp. 461-468. DOI: 0022-3565/01/2982-461-468.
5. Kang Y.J., Zhou Z.X., Wang G.W., Buridi A., Klein J.B. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 18. DOI: 10.1074/jbc.275.18.13690.
6. Pan G., Humke E.W., Dixit V.M. Activation of caspases triggered by cytochrome c *in vitro*. *FEBS Letters*, 1998, vol. 426, no. 1. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00330-5.
7. Ma Y., Ogino T., Kawabata T., Li J., Eguchi K., Okada S. Cupric nitrilotriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome C from mitochondria, and activation of caspase-3. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol.27, no. 1-2. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00083-0.

8. Wu H., Che X., Zheng Q., Wu A., Pan K., Shao A., Wu Q., Zhang J., Hong Y. Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, vol. 10, DOI: 10.7150/ijbs.9719.
9. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash J.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Intracellular Zinc: a Role in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61. DOI: 10.1134/S0006350916060087.
10. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Гончарова Н.В., Слобожанина Е.И. Влияние внутриклеточного уровня ионов цинка на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах и жизнеспособность эритроцитов человека. *Новости медико-биологических наук*, 2011, т. 3, № 1, с. 90-95. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Goncharova N.V., Slobozhanina E.I. Intracellular zinc level effect on the phosphatidylserine redistribution in membranes and viability of human erythrocytes. *News of biomedical sciences*, 2011, vol. 3, no. 1, p. 90-95. (In Russ)]
11. Harmaza Y., Slobozhanina E. Zinc homeostasis and eryptosis. *FEBS Journal*, 2013, vol. 280, suppl. 1. DOI: 10.1111/febs.12339.
12. Raftos J.E., Whillier S., Chapman B.E., Kuchel P.W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, vol. 39, no. 9. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.04.014.
13. Yildiz D., Bagdadioglu T. L-cysteine uptake is stimulated by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene *in vitro* in human erythrocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2004, vol. 14. DOI: 10.1080/10715760600602902.
14. Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. The transport activity of P-glycoprotein upon a change of the redox balance in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia. *Biophysics*, 2016, vol. 61. DOI: 10.1134/S0006350916060257.
15. Ye B., Maret W., Vallee B.L. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, vol. 98, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.041619198.
16. Khatai L., Goessler W., Lorencova H., Zangger K. Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 12. DOI:10.1111/j.1432-1033.2004.04160.x.
17. Dineley K.E., Votyakova T.V., Reynolds I.J. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 2003, vol. 85, no. 3. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01678.x.
18. Dineley K.E., Richards L.L., Votyakova T.V., Reynolds I.J. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, 2005, vol. 5, no. 1. DOI: 10.1016/j.mito.2004.11.001.
19. Dineley K.E., Scanlon J.M., Kress G.J., Stout A.K., Reynolds I.J. Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn²⁺]_i. *Neurobiology of Disease*, 2000, vol. 7, no. 4. DOI: 10.1006/nbdi.2000.0303.
20. Sensi S.L., Yin H.Z., Carriedo S.G., Rao S.S., Weiss J. H. Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺ permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2414.
21. Napolitano R., De Matteis S., Lucchesi A., Carloni S., Cangini D., Musuraca G., Liardo E.V., Norata M., Fattori P.P. Pentoxifylline-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia: New Insights into Molecular Mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018, vol. 18, no. 3. DOI: 10.2174/1389557517666171002162258.
22. Rozovski U., Harris D.M., Li P., Liu Z., Wu J.Y., Grgurevic S., Faderl S., Ferrajoli A., Wierda W.G., Martinez M., Verstovsek S., Keating M.J., Estrov Z. At High Levels, Constitutively Activated STAT3 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Journal of Immunology*, 2016, vol. 196, no. 10. DOI: 10.4049/jimmunol.1402108.

ROLE OF METALLOTHIONEINES IN MAINTAINS OF LEUKEMIC LYMPHOCYTES VIABILITY UNDER REDOX-BALANCE MODIFICATION

Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Bialevich K.I., Slobozhanina E.I.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus
Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: tayzoe@mail.ru

Abstract. Expression of cysteine-containing low molecular weight proteins – metallothioneins and activity of cysteine protease – caspase-3 in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia were evaluated before and after modification of their redox status. An increased caspase-3 activity was detected in lymphocytes of patients with B-CLL compared to normal cells under physiological condition. H₂O₂-induced oxidative stress in leukemic cells led to the activation of caspase-dependent apoptotic processes. It has been established that metallothioneins are the main triggers in this process. These polypeptides can deposit zinc ions and thereby play a significant role in process mediated by cell zinc signaling under chronic B-lymphocytic leukemia.

Key words: chronic B-lymphocytic leukemia, metallothioneins, caspase-3, redox-state, zinc homeostasis.