

На правах рукописи

ПЕРСИЯНОВА Вера Олеговна

НАДФН-оксидазная активность клеток иммунной системы и
ее роль в глюкокортикоид-зависимом апоптозе тимоцитов

14.00.36 - Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2003

Работа выполнена в ГУ НИИ клинической иммунологии
Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель:

академик РАМН, д.м.н., профессор

В.А. Козлов

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

В.С. Ширинский

доктор медицинских наук

М.И. Душкин

Ведущая организация:

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии
СО РАМН

Защита состоится "10" февраля 2003 г. в 14 часов на
заседании диссертационного совета Д 001.001.01 ГУ НИИ клинической
иммунологии СО РАМН по адресу:

630091, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ
клинической иммунологии СО РАМН

Автореферат разослан "10" февраля 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

О.Т. Кудаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение регуляторных механизмов иммунных реакций является одной из важнейших задач современной иммунологии, поскольку понимание этих процессов позволяет судить о функционировании иммунной системы и дает ключи к правильному применению экзогенных модулирующих воздействий. Одними из основных естественных физиологических регуляторов иммунной системы являются глюкокортикоидные гормоны (ГК), которые способны регулировать множество иммунных реакций, в том числе такие процессы, как пролиферация и апоптоз клеток иммунной системы, что в свою очередь определяет дальнейшее развитие иммунного ответа как по клеточному, так и по гуморальному типу.

Не смотря на то, что ГК-зависимый апоптоз интенсивно изучается на протяжении многих лет, его механизм до сих пор окончательно не выяснен. Согласно общепринятой концепции стероидные гормоны осуществляют свое воздействие через клеточный геном, но неизвестно, какие именно гены являются ответственными за выполнение программы ГК-индуцированного апоптоза. В литературе обсуждаются экстрагеномные эффекты стероидных гормонов, в том числе их участие в индукции апоптоза. Но среди этих эффектов не описано влияние ГК на продукцию клетками активированных кислородных метаболитов (АКМ), в частности супероксид-аниона (O_2^-) и перекиси водорода. Считается, что ГК подавляют этот вид клеточной активности, при этом влияние гормонов объясняется подавлением экспрессии генов НАДФН-оксидазы, ферментного комплекса, ответственного за быструю продукцию АКМ в ответ на внешние стимулы. В 1986 году было показано стимулирующее влияние ГК на продукцию АКМ фагоцитами селезенки, и был предположен экстрагеномный механизм обнаруженного эффекта [Вольский Н.Н. и др., 1986]. Однако в литературе нет экспериментальных работ, прямо подтверждающих это предположение. Исходя из

вышеприведенных данных, актуальность выполненной работы связана не только с исследованием предполагаемого экстрагенетического механизма влияния ГК на продукцию АКМ клетками иммунной системы, но и с изучением роли этого свойства ГК в реализации иммунорегуляторных эффектов, в частности апоптоза клеток иммунной системы.

Цель работы и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы было исследование механизма стимулирующего влияния ГК на O_2^- -генерирующую активность клеток иммунной системы и роли этого свойства ГК в ГК-индуцированном апоптозе тимоцитов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать возможность стимулирующего влияния ГК на O_2^- -генерирующую активность клеток иммунной системы в условиях, исключающих участие генетического аппарата клеток в опосредовании этого влияния (в бесклеточной системе).

2. Охарактеризовать стимулирующий эффект ГК на НАДФН-оксидазу в зависимости от концентрации гормонов, температуры и срока инкубации, исходного состояния клеток.

3. Изучить возможное участие АКМ в ГК-индуцированном апоптозе тимоцитов путем удаления АКМ из среды культивирования, а также определить конкретный тип АКМ, индуцирующий запуск этой клеточной программы.

4. Изучить влияние ингибиторов НАДФН-оксидазы на интенсивность ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов, и таким образом определить роль стимуляции этого фермента гормонами в механизме индукции апоптоза.

Научная новизна. Впервые в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано активирующее влияние ГК на генерацию O_2^- НАДФН-оксидазой перитонеальных макрофагов в бесклеточной системе, что свидетельствует об их прямом влиянии на активность фермента.

Кроме того доказано участие стимулированной глюкокортикоидами продукции АКМ в механизме ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов мыши.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные приводят к новому пониманию механизма ГК-индуцированного апоптоза, а также позволяет предположить участие этого свойства ГК в реализации других эффектов ГК на иммунную систему. Стимуляция продукции АКМ и смещение редокс-баланса клеток в сторону окислительного стресса на ранних этапах воздействия ГК должно учитываться при практическом применении этих гормонов в качестве терапевтических средств. В частности, резистентность некоторых лимфоидных опухолей к лечению глюкокортикоидами может быть связана с повышенной активностью антиоксидантных систем клетки.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. ГК прямо влияет на активность НАДФН-оксидазы клеток иммунной системы, стимулируя генерацию АКМ в бесклеточной системе.
2. Стимулирующее влияние ГК на НАДФН-оксидазу клеток иммунной системы является важным звеном в механизме ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 4-й и 5-й отчетных сессиях ИКИ СО РАМН (Новосибирск, 1996 и 2000 гг.), на 10-ом международном конгрессе иммунологов (Дели, 1998 г.), на II Всероссийском симпозиуме " Хроническое воспаление" (Новосибирск, 2000 г.), на семинаре экспериментального отдела ИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2002 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на ¹²⁴ страницах машинописного текста, включающего 29 рисунков, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования; трех глав, содержащих результаты собственных

исследований, обсуждения, заключения и выводов. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 284 источника, из них 15 на русском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования проводились на гибридных мышцах-самцах (СВАхС57В1)F₁. Животных получали из питомника клиники животных СО РАМН (пос. Нижняя Ельцовка, г. Новосибирск) и использовали в возрасте от 2 до 6 месяцев. Содержание животных до и в период поведения экспериментов осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Для получения бесклеточной системы свежесыводенные перитонеальные макрофаги разрушали в гомогенизаторе со стеклянным порошком на льду, полученную смесь центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли содержание белка методом Лоури [Кочетов Г.А., 1971]

Активность НАД(Ф)Н-оксидазы определяли двумя стандартными методами, основанными на спектрофотометрической оценке скорости восстановления супероксидным анионом нитросинего тетразолия (НСТ, результаты выражали в условных единицах $OD \times 1000 / 10^7$ клеток либо на 100 мкг белка) [Вольский Н.Н., 1987] и СОД-ингибируемого восстановления цитохрома с (результаты выражались в $\mu\text{моль/мин}/10^7$ клеток, используя для пересчета коэффициент абсорбции $\epsilon = 21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Clark R.A., 1987].

Тимоциты культивировались в стандартной культуральной среде, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (5% CO₂, 37° С). В данных экспериментальных условиях исследовалось влияние на жизнеспособность тимоцитов дексаметазона (KRKA, Словения), каталазы (Serva, USA), дифенилениодонима (Sigma, USA), кромолина (Rhone-

Poulenc, France-USA).

После окончания культивирования жизнеспособность клеток определялась с помощью окрашивания трипановым синим (0,1% раствор). Интенсивность апоптоза определялась с помощью МТТ-теста [Казанский Д.Б., 1995] и на проточном цитофлюориметре (FACScan, Beston Dickinson) с помощью двойного окрашивания клеток флюоресцеин диацетатом (ФДА) и пропидиум иодидом (ПИ) (ICN, USA) [Kawano M.M., 1995, Ross D.D., 1989]. Принцип последнего метода заключается в различном окрашивании живых, мертвых и апоптозных клеток ФДА и ПИ. Живые клетки окрашиваются только ФДА, так как способны переводить его из нефлюоресцирующей формы во флюоресцирующую благодаря активности внутриклеточных эстераз. Мертвые клетки окрашиваются только ПИ, поскольку ПИ проникает внутрь клетки через повреждения в мембране. Апоптозные клетки не окрашиваются ни ФДА, ни ПИ. Таким образом, данный метод позволяет отдельно оценить количество живых, мертвых и апоптозных клеток в пробе.

Статистическую оценку значимости различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни, используя программу "Statistica 5.0"

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния ГК на скорость генерации O_2^- мембранной НАДФН-оксидазой клеток в условиях бесклеточной системы.

В наших опытах как гидрокортизон, так и преднизолон достоверно повышали скорость генерации O_2^- в бесклеточной системе из перитонеальных макрофагов мыши (Рис. 1). Это увеличение составляло от 52 до 186% в различных экспериментах. Весь прирост скорости генерации O_2^- под действием ГК снимался добавлением $Cu(Lys)_2$, хелата меди с супероксиддисмутазной активностью, что свидетельствует о супероксид-

зависимом характере этого процесса (Рис. 2).

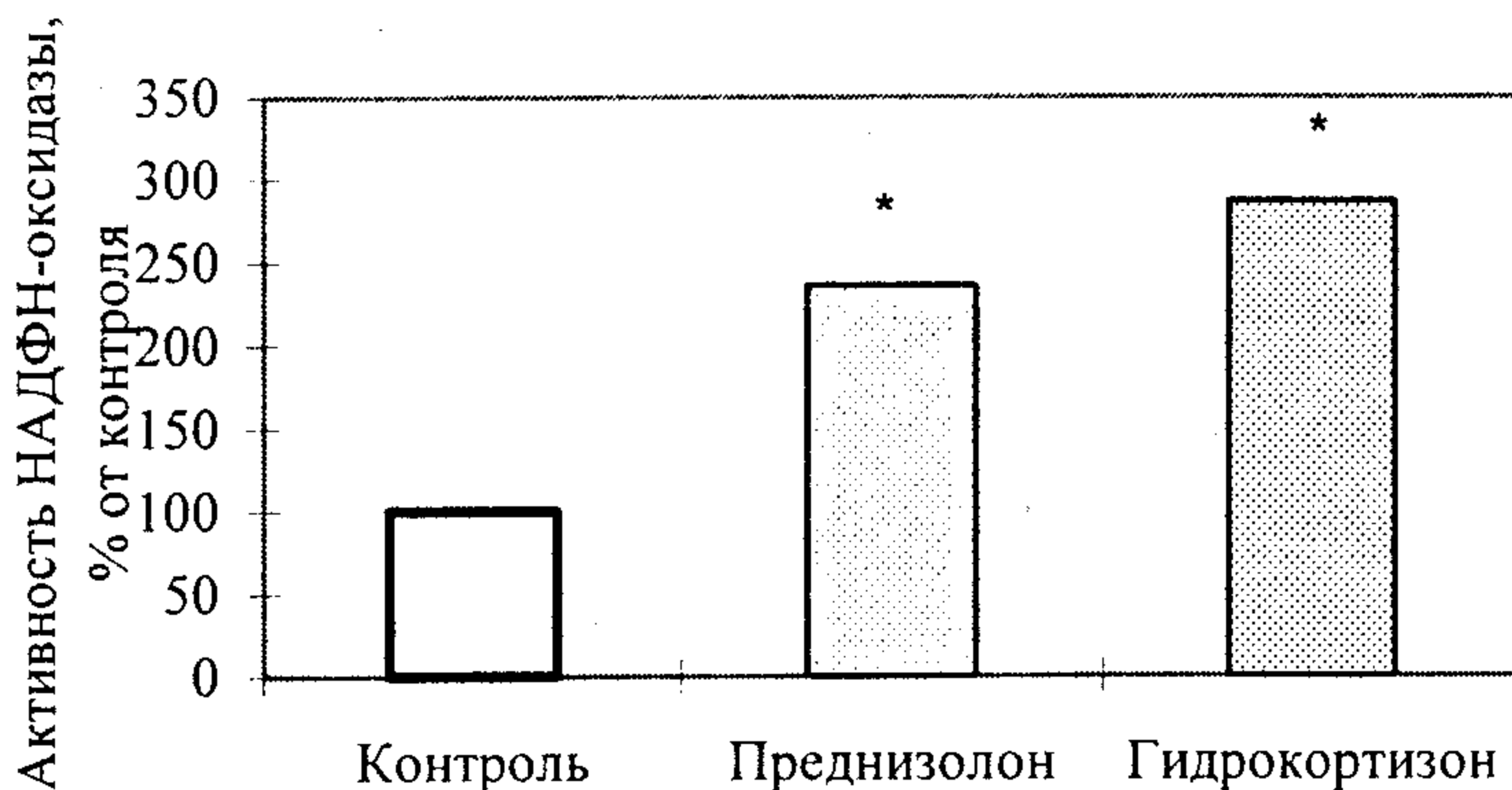


Рисунок 1. Влияние глюкокортикоидных гормонов на продукцию O_2^- в бесклеточной системе из перитонеальных макрофагов мыши. Преднизолон - 400 μ М, гидрокортизон - 400 μ М. Время инкубации 40 минут. Метод определения: восстановление НСТ.

* достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

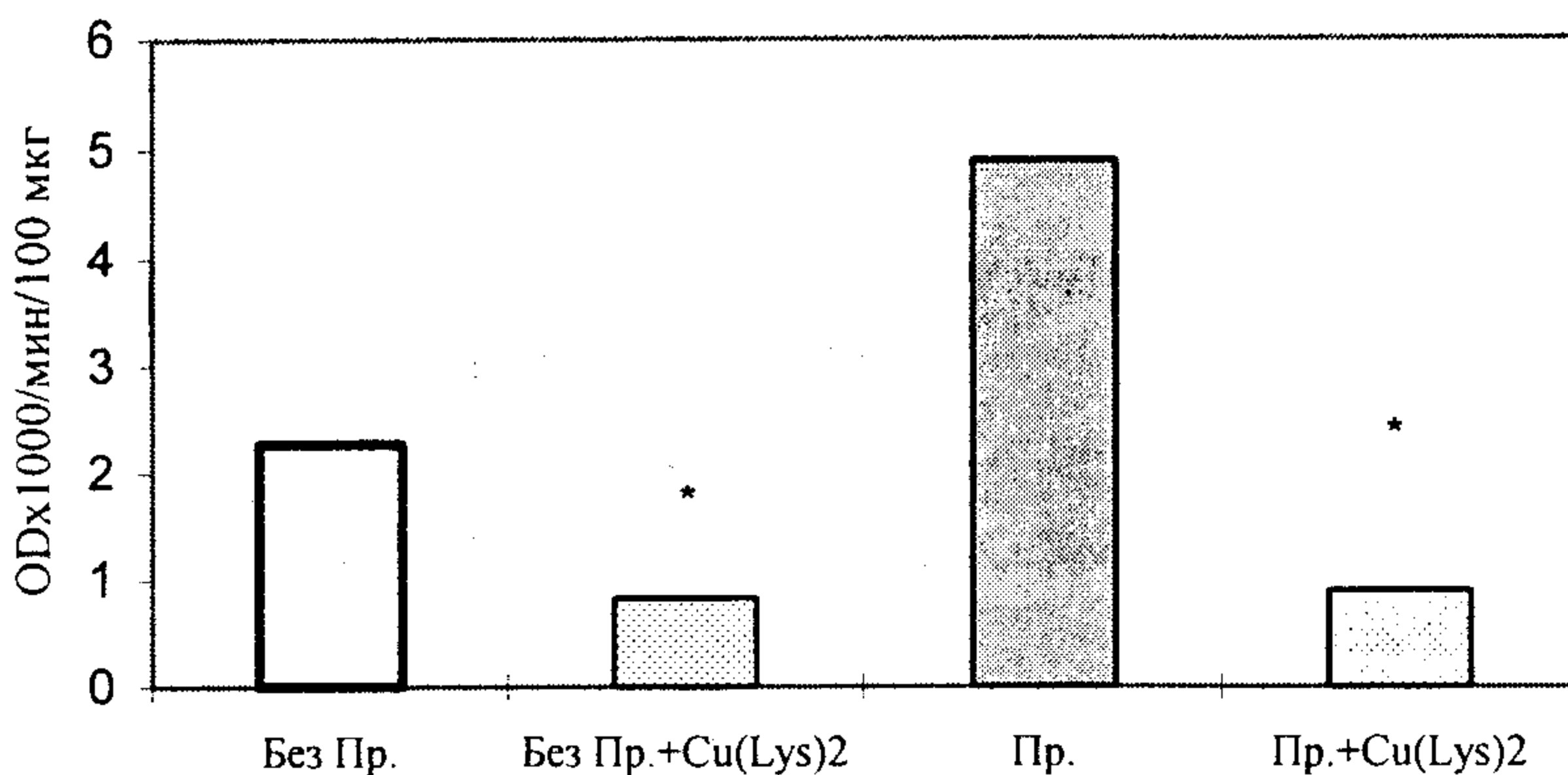


Рисунок 2. Влияние $Cu(Lys)_2$ (100 μ М) на скорость продукции O_2^- в бесклеточной системе из перитонеальных макрофагов мыши. Пр. - 400 μ М преднизолона. Время инкубации - 15 минут. Метод определения: восстановление НСТ.

* достоверное отличие от соответствующего контроля ($p < 0,05$).

Исследуемый эффект ГК был дозозависимым и проявлялся сразу после добавления гормонов в систему, без какого-либо лаг-периода. (Рис. 3).

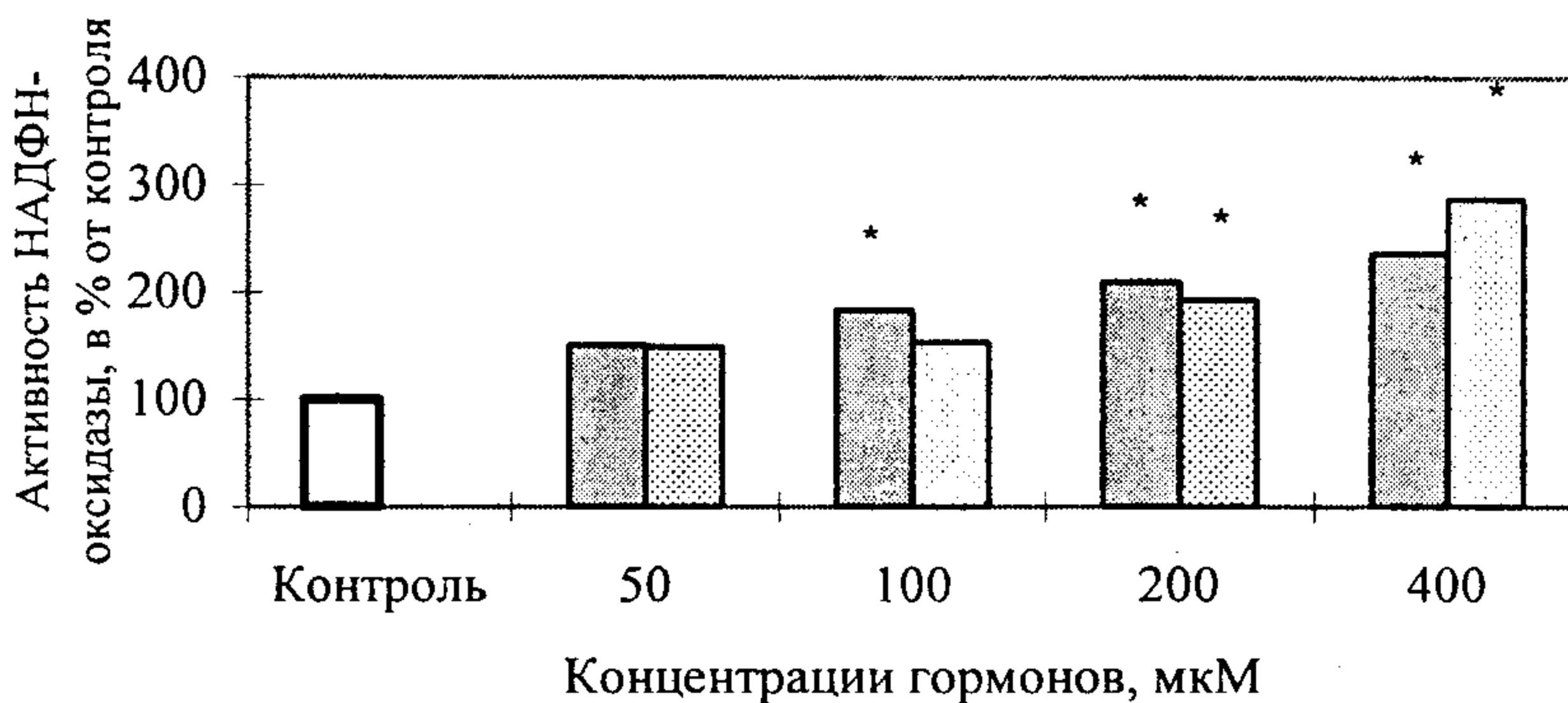


Рисунок 3. Влияние различных концентраций стероидов (μM) на скорость продукции O_2^- в бесклеточной системе из перитонеальных макрофагов мыши. Гладкоокрашенные столбы - пробы с преднизолоном, заштрихованные - пробы с гидрокортизоном. Время инкубации - 40 минут. Метод определения: восстановление НСТ.

* достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Поскольку эксперименты проводились в условиях, позволяющих полностью исключить эффекты ГК, опосредованные через клеточный геном, было сделано заключение, что способность ГК стимулировать O_2^- -генерирующую активность клеток относится к экстрагеномным эффектам ГК. Продукция O_2^- в бесклеточной системе прямо зависела от концентрации белка в пробах, от температуры среды, наличия восстановительных эквивалентов (НАДФН или НАДН), а также от исходного функционального состояния клеток.

Дексаметазон, синтетический аналог ГК, широко используемый в

экспериментах для индукции апоптоза различных клеток, в том числе тимоцитов, в наших экспериментах в концентрации 100 μM повышал продукцию O_2^- как в целых клетках, так и в бесклеточной системе из тимоцитов мыши (Рис. 4а, 4б).

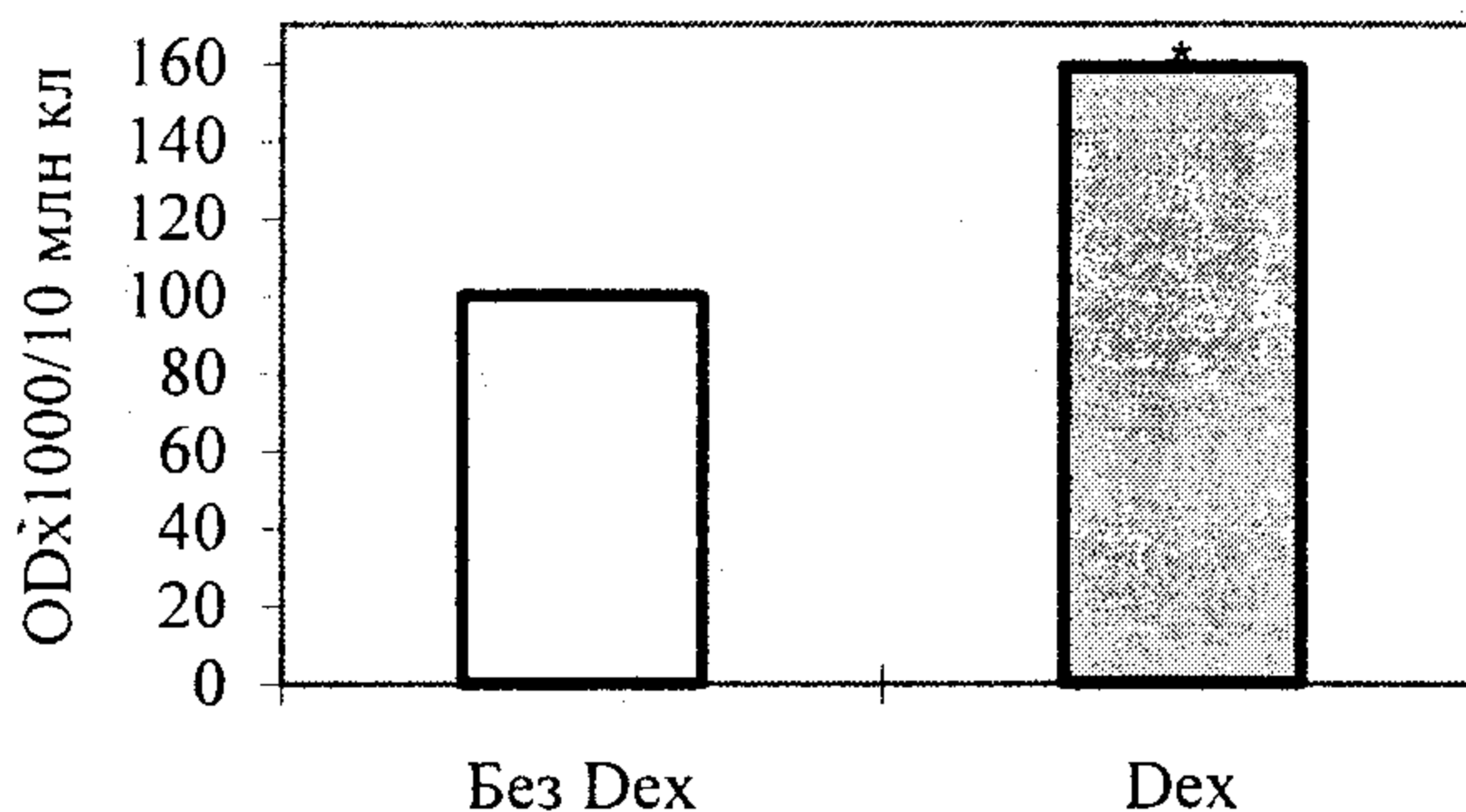


Рисунок 4а. Влияние дексаметазона (100 μM) на скорость продукции O_2^- в целых клетках тимуса мыши. Метод определения: восстановление НСТ.

* достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

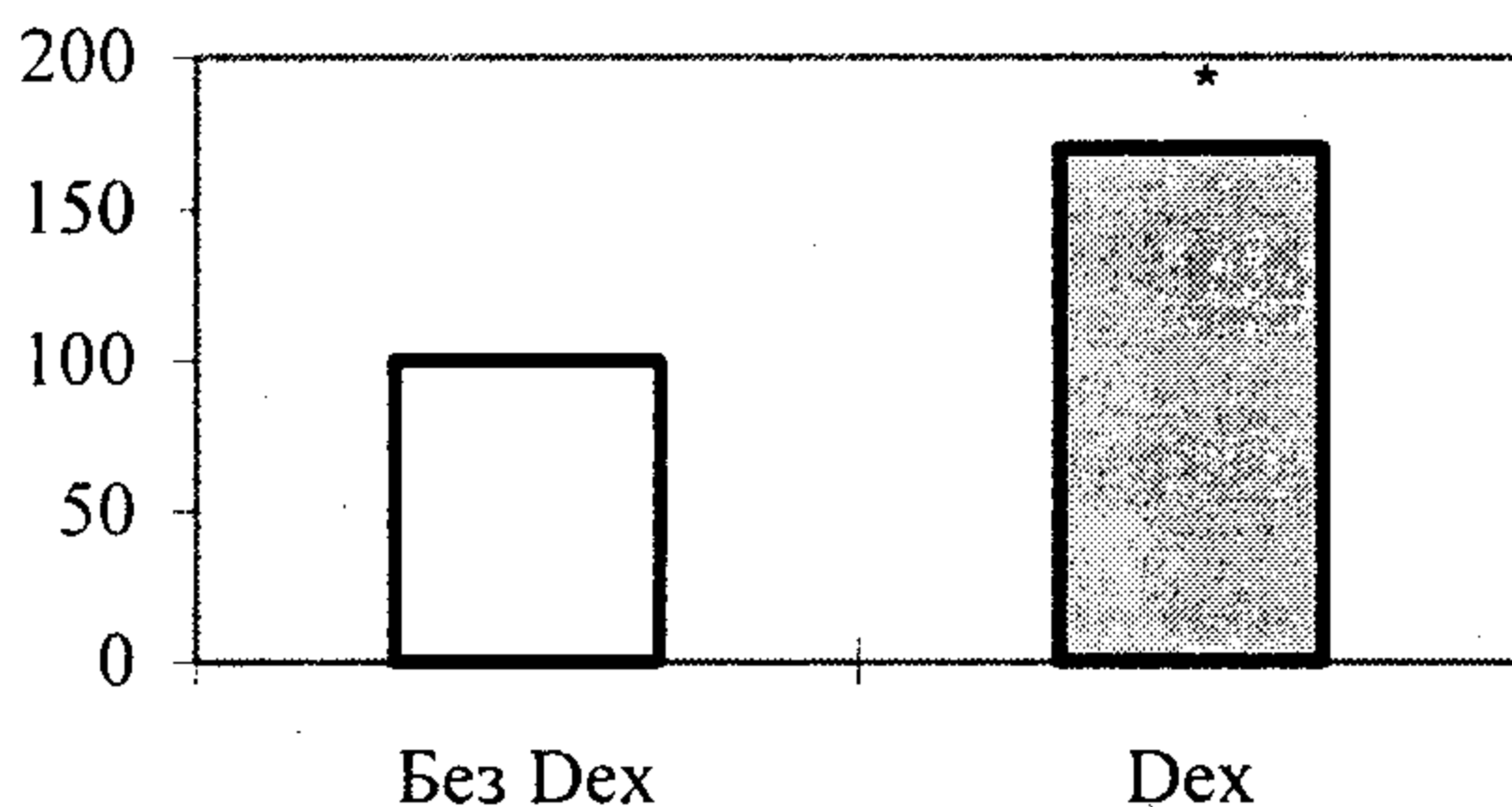


Рисунок 4 . Влияние дексаметазона (100 μM) на скорость продукции O_2^- в бесклеточной системе из тимоцитов мыши. За 100% принята скорость генерации O_2^- в гомогенате в отсутствие гормона. Метод определения: СОД-ингибируемое восстановление цитохрома с .

* достоверное отличие от контроля ($p < 0,02$).

Продукция O_2^- составила 270 пмоль/мин/ 10^7 клеток в бесклеточной системе из интактных клеток; и 460 пмоль/мин/ 10^7 клеток при стимуляции дексаметазоном.

Таким образом, впервые было показано, что способность глюкокортикоидов повышать O_2^- -генерирующую активность в бесклеточной системе как из перитонеальных макрофагов, так и из тимоцитов мыши, относится к экстрагеномным эффектам глюкокортикоидных гормонов.

Роль перекиси водорода в дексаметазон-индуцированном апоптозе тимоцитов мыши. Защитный эффект каталазы.

Согласно нашему предположению, свойство ГК стимулировать продукцию АКМ клетками может опосредовать, по крайней мере частично, иммунорегуляторные эффекты этих гормонов. В наших экспериментах добавление каталазы, фермента, удаляющего из среды культивирования перекись водорода, достоверно ингибировало дексаметазон-индуцированный апоптоз тимоцитов мыши. (Рис. 5, 6)

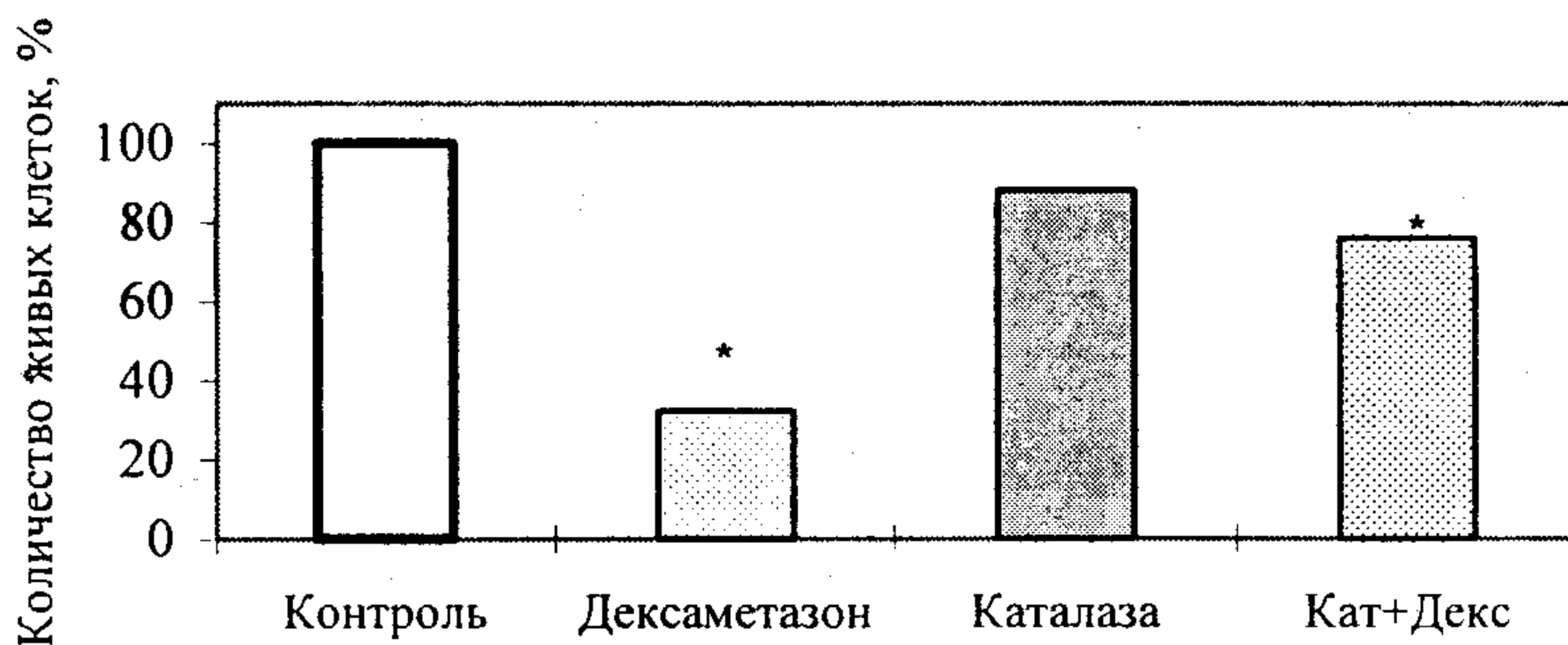


Рисунок 5. Влияние каталазы (100 U/ml) на ГК-индуцированный апоптоз тимоцитов мыши. Концентрация дексаметазона - 100 μ M. Время инкубации - 6 часов. За 100% принято количество живых клеток в контроле. Определение на проточном цитофлюориметре с помощью двойного окрашивания.

* достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

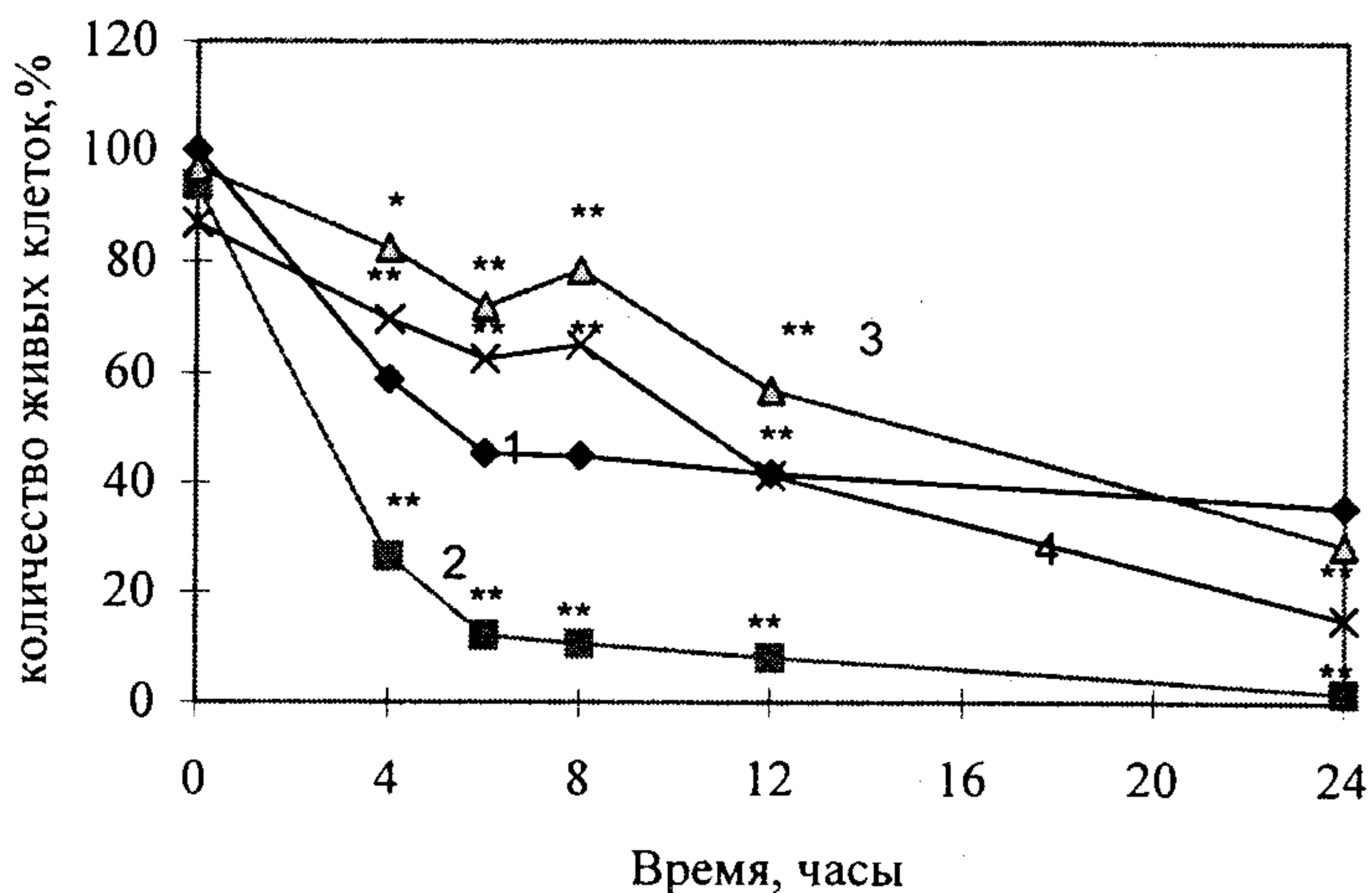


Рисунок 6. Влияние каталазы на интенсивность апоптоза тимоцитов мыши, индуцированного дексаметазоном. 1 - контроль, 2 - тимоциты + 100 μМ дексаметазона, 3 - тимоциты + 500 U/ml каталазы, 4 - тимоциты + 100 μМ дексаметазона + 500 U/ml каталазы. За 100% принято количество жизнеспособных клеток в контроле сразу после выделения. Метод определения: восстановление МТТ жизнеспособными клетками.,

*** достоверное отличие от соответствующего контроля ($p < 0,05$)**

**** достоверное отличие от соответствующего контроля ($p < 0,001$)**

Поскольку содержание сыворотки в культуральной среде было снижено до 5%, в контрольных пробах происходил интенсивный спонтанный апоптоз тимоцитов. Добавление каталазы к пробам без гормона достоверно ингибировало этот вид клеточной гибели. То, что каталаза защищала клетки как при гормон-индуцированном, так и при спонтанном апоптозе убедительно свидетельствует об участии перекиси водорода в этих процессах. Таким образом, описанные эксперименты доказывают зависимость ГК-индуцированного апоптоза от присутствия в среде инкубации АКМ, в частности, H_2O_2 .

Влияние ингибиторов НАДФН-оксидазы на дексаметазон-индуцированный апоптоз тимоцитов мыши.

Как описано выше, было показано, что:

1) ГК стимулируют АКМ-продуцирующую активность клеток, в том числе клеток тимуса мыши.

2) Удаление H_2O_2 из среды инкубации резко ингибирует глюкокортикоид-зависимый апоптоз.

Для того, чтобы доказать, что эти факты являются звеньями единого механизма, опосредующего индукцию апоптоза тимоцитов гормонами, было исследовано влияние ингибиторов НАДФН-оксидазы, на интенсивность ГК-зависимого апоптоза тимоцитов мыши. Было показано, что блокада этого фермента ингибиторами дифенилениодониумом и кромолином вызывает достоверное ($p < 0,01$) снижение интенсивности дексаметазон-индуцированного апоптоза, причем классический ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодониум в концентрации $2 \mu M$ полностью подавлял ГК-зависимый апоптоз клеток, снижая количество апоптозных клеток до контрольных значений (Рис. 7, 8)

Таким образом, полученные в данной работе экспериментальные результаты убедительно свидетельствуют, что стимулирующее влияние ГК на НАДФН-оксидазный ферментный комплекс является ключевым звеном в механизме индукции этими гормонами апоптоза. Это позволяет предположить участие данного свойства ГК в регуляции различных иммунных реакций и, следовательно, предлагает новые подходы к модуляции влияния ГК на иммунную систему.

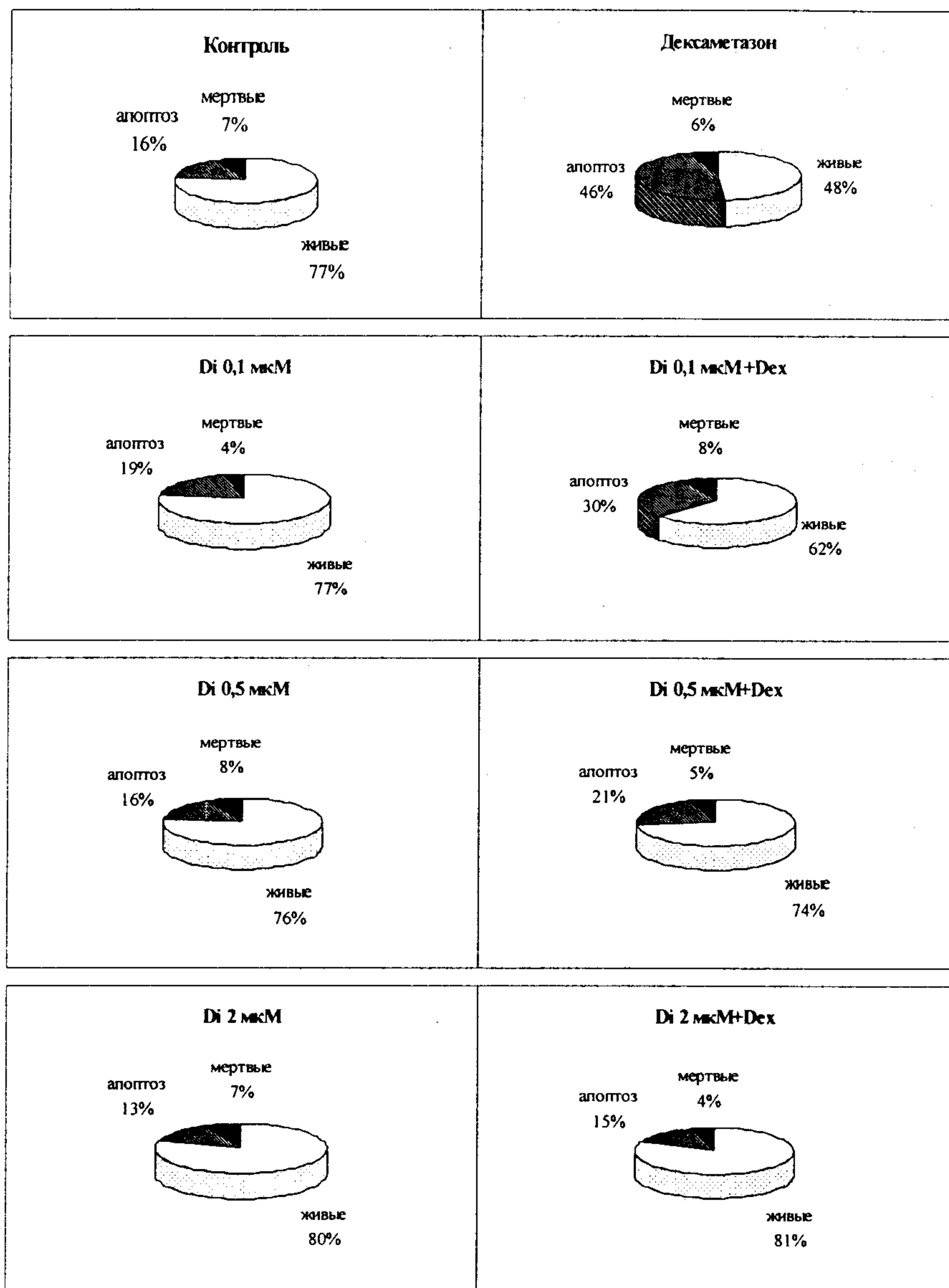


Рисунок 7. Влияние различных концентраций дифенилениодонидума на интенсивность ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов мыши. Концентрация дексаметазона - 100 μM. Время инкубации - 6 часов. Определение на проточном цитофлуориметре с помощью двойного окрашивания.

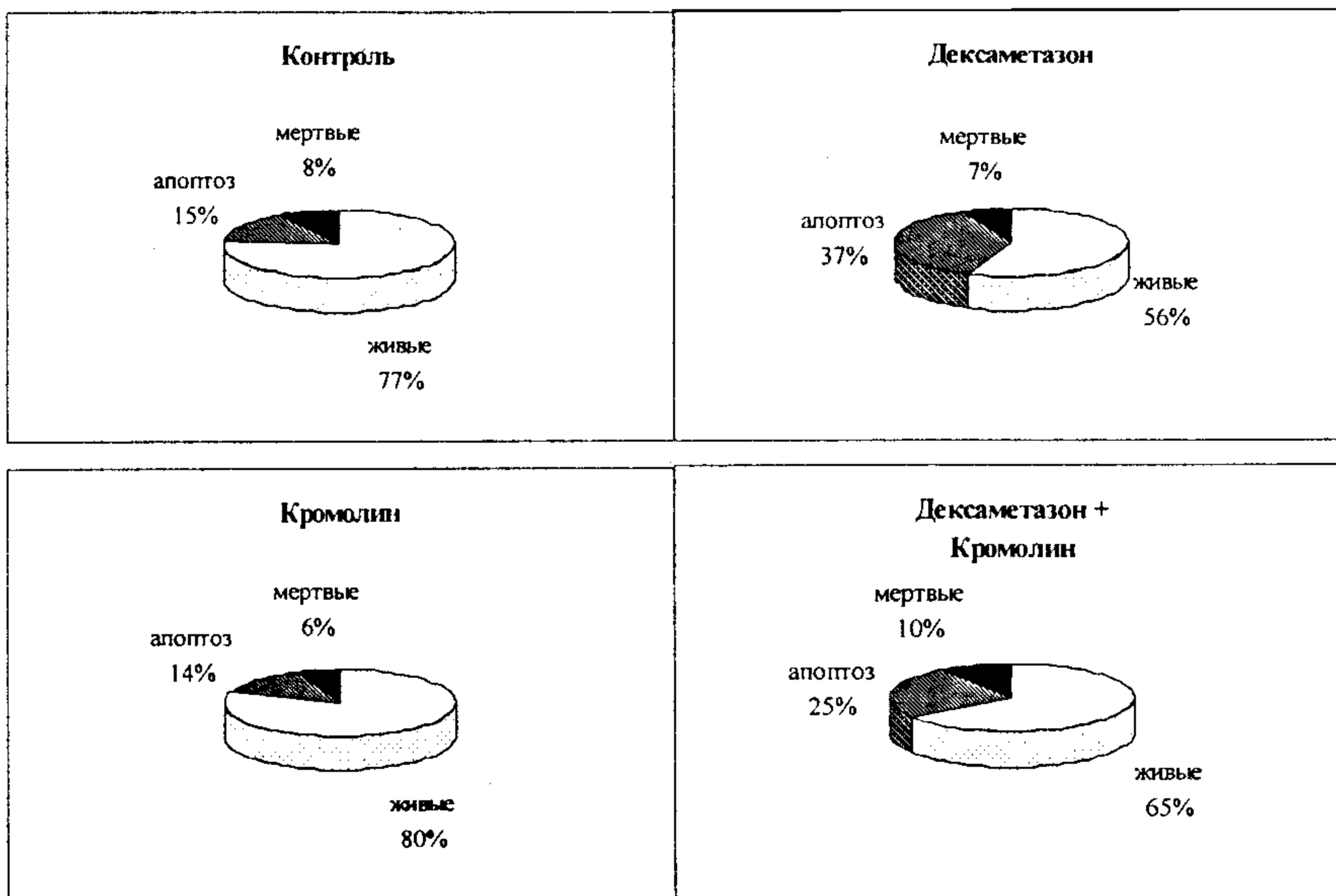


Рисунок 8. Влияние кромалина (50 μ M) на интенсивность ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов мыши. Концентрация дексаметазона -100 μ M. Время инкубации - 6 часов. Определение на проточном цитофлуориметре с помощью двойного окрашивания.

ВЫВОДЫ

1. Глюкокортикоидные гормоны, в частности, гидрокортизон, и их синтетические аналоги, преднизолон и дексаметазон, оказывают стимулирующее влияние на мембранную НАДФН-оксидазу перитонеальных макрофагов и макрофагов тимуса мыши в бесклеточной системе, увеличивая скорость генерации супероксидного аниона, что свидетельствует о прямом действии гормонов на активность фермента.

2. Каталаза, разлагая перекись водорода, ингибирует индуцированный дексаметазоном апоптоз тимоцитов мыши, что доказывает участие H_2O_2 в механизме глюкокортикоид-зависимого апоптоза.

3. Перекись водорода участвует в механизме спонтанного апоптоза тимоцитов мыши *in vitro*, что подтверждается ингибирующим влиянием каталазы на этот процесс.

4. Стимуляция глeкoкoртикoидными гoрмонами НАДФН-oкcидaзы является нeобхoдимым звeнoм в мeхaнизмe индукции aпoптoзa тимоцитoв глeкoкoртикoидaми, пoскoльку ингибирование активности этoгo фермeнтa кaк дифeнилeниoдoниумoм, тaк и крoмoлином пoдaвляeт aпoптoз, индуцирoванный дeксaмeтaзoнoм.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Persijanova V.O., Volsky N.N., Kozlov V.A. Glucocorticoids increase NADPH oxidase activity in cell-free system // 27th Scand. Soc. Immunol. Meet. Abstracts. - Turku, 1996. - p. 731

2. Персиянова В.О., Вольский Н.Н. Стимулирующее влияние глeкoкoртикoидoв на активность НАД(Ф)Н-oкcидaзы макрофагoв мыши в бесклетoчной системe // Клиничеcкие и эксперимeнтальные исследования молодых ученых СО РАМН. Сборник тезисoв. - Новосибирск. - 1996. - с. 93

3. Персиянова В.О. Участие активированных кислородных метaбoлитoв в aпoптoзе тимоцитoв, индуцирoваннoм глeкoкoртикoидными гoрмонами // ИКИ СО РАМН. Научный oтчет 1996. - Новосибирск. - 1997. - с. 42

4. Вольский Н.Н., Персиянова В.О., Гребенщикoв А.Ю., Кoзлов В.А. Участие АКМ в индуцирoваннoм глeкoкoртикoидaми aпoптoзе тимоцитoв мыши // Иммунология. - 1998. - N 5. - с. 44-46

5. Persianova V.O., Volsky N.N., Grebenshikov A.Yu., Kozlov V.A. The involvement of reactive oxygen species in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphocytes // 10th Intern. Congr. Immunol. - The immunologist. - 1998. - Suppl. 1. - p. 543

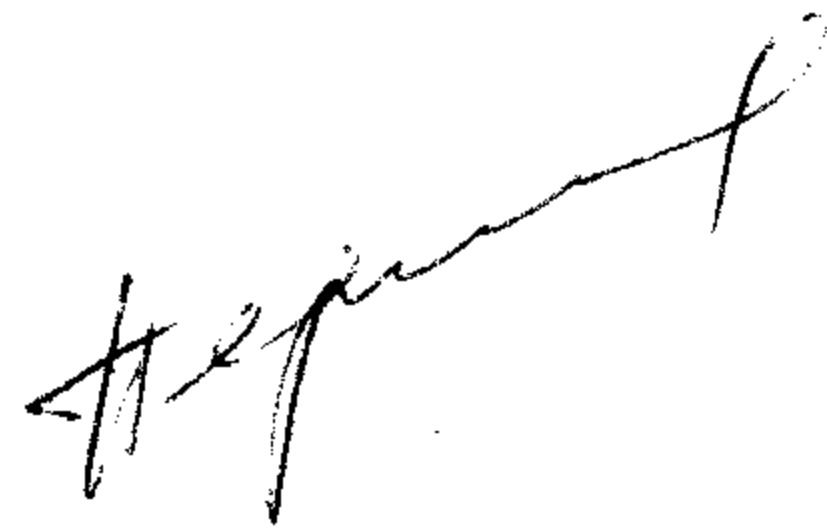
6. Вольский Н.Н., Персиянова В.О., Кoзлов В.А. Ингибитор НАДФН-oкcидaзы дифeнилeниoдoниум пoдaвляeт aпoптoз тимоцитoв,

индуцированный глюкокортикоидами // II съезд иммунологов России. Сочи, 1999. - Russ. J. Immunol. - 1999. - v. 4. - Suppl. 1. - с. 31

7. Вольский Н.Н., Персиянова В.О. Глюкокортикоидные гормоны и окислительный стресс // Фундаментальные и клинические аспекты хронического воспаления. Тезисы докладов II Всероссийского симпозиума "Хроническое воспаление". - Новосибирск. - 2000. - с. 87

8. Персиянова В.О., Вольский Н.Н., Киселев С.В. Ключевая роль НАД(Ф)Н-оксидазы в индукции апоптоза тимоцитов глюкокортикоидными гормонами // ИКИ СО РАМН. Научный отчет 2000. - Новосибирск. - 2000 - с. 99

9. Volsky N.N., Persijanova V.O., Kozlov V.A. Membrane NADPH oxidase and hormonal regulation of the immunocompetent cell functional activity. // Russ. J. Immunol. - 2001. - v. 6. - N 2. - p. 148-156

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Персиянова' (Persijanova), written in a cursive style.