

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 612.016.2:612.112.94].084

В. О. Персиянова, Н. Н. Вольский,
А. Ю. Гребенщиков, В. А. КозловУЧАСТИЕ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ
МЕТАБОЛИТОВ В ИНДУЦИРОВАННОМ ГЛЮ-
КОКОРТИКОИДАМИ АПОПТОЗЕ ТИМОЦИТОВ
МЫШИ

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Глюкокортикоидные гормоны являются одним из главных физиологических регуляторов активности иммунокомпетентных клеток *in vivo* и способны оказывать значительное влияние на направление и степень выраженности иммунных реакций, воздействуя на различные этапы их формирования.

Ранее нами было обнаружено [1, 6], что действие гидрокортизона на фагоцитирующие клетки *in vivo* и *in vitro* приводит к стимуляции активности НАД(Ф)·Н-оксидазы, фермента, играющего ключевую роль в процессе генерации этими клетками супероксидного радикала O_2^- и других активированных кислородных метаболитов (АКМ). Показано, что глюкокортикоидные гормоны непосредственно воздействуют на активность НАД(Ф)·Н-оксидазы и в 1,5–2,5 раза увеличивают скорость продукции O_2^- в гомогенатах перитонеальных макрофагов мыши [6].

Исходя из этого, мы предположили, что влияние глюкокортикоидов на НАД(Ф)·Н-оксидазу, изменяющее скорость генерации АКМ в иммунокомпетентных клетках, может опосредовать некоторые эффекты этих гормонов на иммунную систему. Одним из возможных механизмов иммунорегуляторного действия глюкокортикоидных гормонов, опосредуемых гормональной регуляцией продукции АКМ, может быть апоптоз лимфоцитов. Запрограммированная гибель лимфоцитов (и других клеток) является одним из главных способов физиологической регуляции численности клеточных популяций, а глюкокортикоиды — важ-

ным физиологическим агентом, индуцирующим апоптоз [8]. Особенно чувствительны к глюкокортикоидиндуцированному апоптозу тимоциты. В то же время хорошо известно, что апоптоз тимоцитов может быть вызван индукцией окислительного стресса и повышенной генерацией АКМ [3, 9]. Вполне вероятно, что увеличение продукции АКМ макрофагами тимуса может служить механизмом апоптоза и в тех случаях, когда он индуцируется глюкокортикоидами.

Целью настоящей работы явилась экспериментальная проверка данного предположения.

Методика исследований. Эксперименты выполнены на клетках тимуса мышей-самцов (СВА × С57В1)F₁ в возрасте 3–4 мес, полученных из питомника "Столбовая" РАМН.

Глюкокортикоидиндуцированный апоптоз тимоцитов оценивали по методике [5]. Тимоциты мышей культивировали при 37°C в 96-луночных круглодонных планшетах "Linbro" ($4 \cdot 10^5$ клеток на лунку) в среде RPMI 1640, содержащей 5% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин и 80 мкг/мл гентамицина. Апоптоз индуцировали добавлением в лунки дексаметазона фосфата (КРКА, Словения) в конечной концентрации 100 мкМ. Для удаления из среды культивации образующейся H_2O_2 в часть лунок добавляли каталазу ("Serva") в дозе 500 ЕД/мл. Через 12 ч культивирования количество жизнеспособных клеток в культурах определяли стандартным методом с трипановыми синим.

Фрагментацию ДНК в клетках через 6 ч после индукции в них апоптоза дексаметазоном оценивали общепринятым методом [2], используя электрофорез клеточных гомогенатов в агарозном геле. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали.

Активность НАД(Ф)·Н-оксидазы в гомогенатах клеток тимуса определяли по методу [4], измеряя скорость супероксидзависимого восстановления цитохрома с ("Sigma").

Результаты выражали в виде средних величин, полученных в 3 независимых экспериментах, и ошибок средних ($M \pm m$). Статистическую достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что добавление дексаметазона (100 мкМ) к гомогенатам клеток тимуса значительно стимулирует

ет их НАД(Ф)·Н-оксидазную активность (продукция O_2^- увеличивается с 274 ± 21 пмоль/мин на 10^7 клеток в контрольных гомогенатах до 464 ± 33 пмоль/мин на 10^7 клеток в тех же гомогенатах после добавления гормона; $p < 0,01$). Это хорошо согласуется с нашими данными, полученными ранее на перитонеальных макрофагах и спленоцитах мышей [1, 6].

Данные, характеризующие влияние такой же концентрации дексаметазона на запрограммированную гибель тимоцитов в культуре, представлены на рис. 1. В соответствии с общеизвестными данными количество жизнеспособных клеток резко снижается (по сравнению с контролем) через 12 ч инкубации с гормоном. На рис. 1 видно также, что эффект дексаметазона в значительной мере снимается в тех клеточных культурах, к которым была добавлена каталаза — фермент, разлагающий H_2O_2 и тем самым снижающий ее стационарную концентрацию в клетках, что в свою очередь должно приводить к снижению концентраций других, производных от H_2O_2 АКМ (гидроксильного радикала, гипогалоидов и др.). В то же время сама по себе каталаза не вызывает (как это видно на рис. 1) увеличения количества жизнеспособных тимоцитов и добавление каталазы приводило в наших экспериментах даже к небольшому снижению количества жизнеспособных клеток через 12 ч культивации. Добавление к культурам клеточ супероксиддисмутазы — фермента, удаляющего из среды O_2^- и ускоряющего его дисмутацию с образованием H_2O_2 , не вызвало значимых изменений интенсивности дексаметазониндуцированного апоптоза тимоцитов (данные не приведены).

На рис. 2 представлены результаты электрофореза ДНК клеток, культивированных в присутствии дексаметазона и каталазы. Как видно на рис. 2, гормон, значительно увеличивая количество фрагментов ДНК, возникающих при апоптозе в результате активации эндонуклеаз, по сравнению с их содержанием в контрольных гомогенатах (соответственно полоски 3 и 1). В тех же культурах клеток, где апоптоз индуцировался дексаметазо-

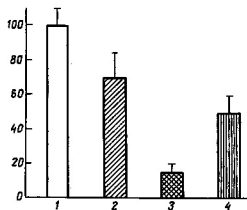


Рис. 1. Влияние каталазы на апоптоз тимоцитов мыши, индуцированный дексаметазоном.

По оси ординат — количество жизнеспособных клеток в культуре (в % от контроля). 1 — тимоциты (контроль); 2 — тимоциты + 500 ЕД/мл каталазы; 3 — тимоциты + 100 мкМ дексаметазона; 4 — тимоциты + 100 мкМ дексаметазона + 500 ЕД/мл каталазы; достоверность различий: $p_{1-2} < 0,001$, $p_{1-3} < 0,01$.

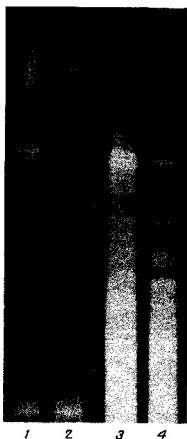


Рис. 2. Влияние каталазы на фрагментацию ДНК в тимоцитах мыши через 6 ч после добавления дексаметазона.

1 — тимоциты (контроль); 2 — тимоциты + 500 ЕД/мл каталазы; 3 — тимоциты + 100 мкМ дексаметазона; 4 — тимоциты + 100 мкМ дексаметазона + 500 ЕД/мл каталазы.

ном в присутствии каталазы (полоска 4), было заметно явное снижение (по сравнению с полоской 3) количества фрагментированной ДНК, что свидетельствует об ингибировании глюкокортикоидиндуцированного апоптоза тимоцитов под воздействием добавленного фермента.

Проведенные эксперименты подтверждают наше предположение о том, что усиление продукции АКМ в фагоцитирующих клетках под воздействием глюкокортикоидов может быть существенным моментом в вызываемой этими гормонами запрограммированной гибели лимфоцитов. Действительно, многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что низкие концентрации H_2O_2 (10–100 мкМ) могут вызывать развитие апоптоза в различных типах клеток [3, 7], а каталаза и другие ферменты с антиоксидантной активностью способны ингибировать процессы апоптоза [7]. Полученные нами данные указывают на то, что дексаметазон вызывает значительное увеличение продукции O_2^- (а следовательно, и возникающей в результате его дисмутации H_2O_2) в клеточных суспензиях тимуса мыши и что в то же время индукция дексаметазоном апоптоза тимоцитов снимается ферментом, снижающим концентрацию H_2O_2 в клетках. Сопоставление этих экспериментально установленных фактов позволяет сделать убедительный, на наш взгляд, вывод о том, что стимуляция продукции АКМ (H_2O_2 и,

возможно, других производных от нее метаболитов) глюкокортикоидными гормонами принимает непосредственное участие в развитии процессов апоптоза, вызванного этими гормонами, а также о решающей роли гормональной регуляции активности НАД(Ф)·Н-оксидазы в этих процессах.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 97-04-49356).

ЛИТЕРАТУРА

1. Волынский Н. Н., Козлов В. А., Лозовой В. П. // Бюл. экпер. биол. — 1987. — Т. 53, № 6. — С. 694—696.
2. Avery R. K., Bleier K. J., Pasternack M. S. // J. Immunol. — 1992. — Vol. 149, N 3. — P. 1265—1270.
3. Butke T. M., Sandstrom P. A. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15, N 1. — P. 7—10.
4. Clark R. A., Leidal K. G., Pearson D. W., Nauseef W. M. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, N 9. — P. 4065—4074.
5. Cohen J. J., Duke R. C. // J. Immunol. — 1984. — Vol. 132, N 1. — P. 238—242.
6. Persijanov V. O., Volsky N. N., Kozlov V. A. // Scand. J. Immunol. — 1996. — Vol. 43, N 6. — P. 731.
7. Sandstrom P. A., Butke T. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90, N 10. — P. 4708—4712.
8. Schwartzman R. A., Cidlowski J. A. // Int. Arch. Allergy Immunol. — 1994. — Vol. 105, N 4. — P. 347—354.
9. Slater A. F. G., Stefan C., Nobel I. et al. // Cell Death Different. — 1996. — Vol. 3, N 1. — P. 57—62.

Поступила 30.07.97

INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN METABOLITES IN GLUCOCORTICOID-INDUCED MURINE THYMOCYTE APOPTOSIS — V. O. Persijanov, N. N. Volsky, A. Yu. Grebenshikov, V. A. Kozlov

Summary. As shown in cell-free system, dexamethasone markedly enhances NAD(P)H-oxidase activity and reactive oxygen metabolites production in murine thymocytes. Catalase (enzyme reducing concentration of hydrogen peroxide and its derivatives in incubation medium) inhibits dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. These findings suggest that glucocorticoid-induced programmed cell death may be mediated through stimulating hormone influence on production of reactive oxygen metabolites.