

**ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАМН**

**НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ 1996**

**ANNUAL REPORT 1996**

**INSTITUTE OF CLINICAL IMMUNOLOGY  
SIBERIAN BRANCH OF RUSSIAN ACADEMY  
OF MEDICAL SCIENCES**

**NOVOSIBIRSK 1997**

## УЧАСТИЕ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В АПОПТОЗЕ ТИМОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННОМ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

*Персиянова В. О.*

Регуляция активности НАД(Ф)Н-оксидазы — фермента, играющего ключевую роль в процессе генерации супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) и других активированных кислородных метаболитов (АКМ) клетками-фагоцитами, тесно связана с эффекторными и иммунорегуляторными функциями этих клеток и оказывает существенное влияние на самые разнообразные физиологические и патологические процессы, в которых участвуют АКМ. Ранее нами было обнаружено, что действие глюкокортикоидов (ГК) на клетки-фагоциты приводит к стимуляции активности НАД(Ф)Н-оксидазы. Было показано, что ГК прямо действуют на НАД(Ф)Н-оксидазу и этот их эффект не опосредуется изменениями активности клеточного генома. Добавленные в среду инкубации ГК в концентрациях от 50 до 400 мкМ, дозозависимо увеличивают продукцию  $O_2^-$  в гомогенатах перитонеальных макрофагов мыши (активность фермента при концентрации 400 мкМ возросла в 2 — 2,5 раза). Предположено, что стимуляция продукции АКМ является важным молекулярным механизмом в развитии иммунорегуляторных эффектов стероидов. Одной из точек действия ГК по предполагаемому механизму может быть апоптоз лимфоцитов. Известно, что ГК являются важными физиологическими агентами, индуцирующими апоптоз. С другой

стороны, показано, что апоптоз тимоцитов может быть вызван индукцией окислительного стресса и повышенной генерацией АКМ, а антиоксиданты (в частности, каталаза) предотвращают апоптозную гибель клеток. Экспериментальная проверка предположения о роли АКМ в развитии ГК-индуцированного апоптоза лимфоцитов была проведена на тимоцитах мышей (CBAxС57Bl)F<sub>1</sub>. Тимоциты инкубировали в стандартных условиях в течение 12 часов. Апоптоз вызывали добавлением в лунки ГК (100 мкМ дексаметазона), в параллельные пробы кроме ГК добавляли каталазу (500 ЕД/мл). Через 12 часов в пробах с ГК гибло 80—90% клеток (по сравнению с пробами без ГК). Удаление из среды инкубации продуцируемой под действием ГК H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> почти вдвое уменьшало апоптозную гибель клеток (40—60% жизнеспособных клеток в пробах с каталазой). Полученные результаты свидетельствуют о существенной роли АКМ-зависимых механизмов в физиологических и иммунофармакологических эффектах ГК.

## THE INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN GLUCOCORTICOID HORMONE-INDUCED APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES

*Persianova V. O.*

NAD(P)H-oxidase plays a crucial role in the superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and other reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytic cells. Regulation of this enzyme activity is closely linked with effector and immunoregulatory functions of these cells and markedly influences the numerous different physiological and pathological processes, in which ROS take part. Previously we found that glucocorticoids (GC) stimulate the activity of NAD(P)H-oxidase in phagocytic cells. The direct effect of GC on this enzyme in contrast to their well-known effects on the gene expression was shown. GC (added to murine peritoneal macrophage homogenates in concentrations from 50 to 400 μM) increase NAD(P)H-oxidase activity in dose-dependent manner. Our results demonstrated 2- to 2,5-fold enhancement of the enzyme activity. This direct hormonal influence on ROS production is likely to play an important role in immunoregulatory effects of GC. Apoptosis of lymphocytes may be one of the points in which hormones act in this way. GC are known as important physiological agents which induce apoptosis. On the other hand, it was shown that apoptosis of lymphocytes is induced by excessive generation of ROS and that antioxidants (among them catalase) prevent apoptotic cell death. We assume that enhancement of ROS production may be a key event in the GC-induced apoptosis and this suggestion was confirmed experimentally. In experiments (CBAxС57Bl)F<sub>1</sub>-mice were used. Murine thymocytes were incubated during 12 h under standard conditions.

Apoptosis was induced by addition of GC (100  $\mu$ M dexamethazone) to cells, in parallel wells beyond GC catalase (500 U/ml) was added. After 12 hours 80—90% cells incubated with GC underwent apoptosis (vs control cells incubated without GC). The removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from incubation medium by catalase reduced the number of apoptotic cells almost by one half (40—60% viable cells in wells with GC and catalase). The data obtained demonstrate a significant role of ROS-dependent mechanisms in the physiological and immunopharmacological actions of glucocorticoid hormones.