

## Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза

Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В., Жукова О.Б., Прохоренко Т.С., Крат И.В., Часовских Н.Ю., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В.

## The role of cytokines in redox-dependent regulation of apoptosis

Chechina O.Ye., Biktasova A.K., Sazonova Ye.V., Zhukova O.B., Prokhorenko T.S., Krat I.V., Chasovskikh N.Yu., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др.

Проведено исследование влияния рекомбинантной формы фактора некроза опухоли  $\alpha$ , интерлейкина-2 и интерлейкина-4 *in vitro* на апоптоз лимфоцитов. Установлено, что проапоптотический эффект данных цитокинов является дозозависимым и реализуется при участии активных форм кислорода и митохондрий.

**Ключевые слова:** лимфоцит, цитокины, апоптоз, активные формы кислорода, митохондрия.

Research of influence of recombinant tumor necrosis factor alpha, interleukin-2 and interleukin-4 *in vitro* on the apoptosis of lymphocytes is performed. It is revealed that a proapoptotic effect of these cytokines is dose-dependent and is realized with the assistance of reactive oxygen species and mitochondrias.

**Key words:** lymphocyte, cytokines, apoptosis, reactive oxygen species, mitochondria.

УДК 616-091.818:576.5

### Введение

Цитокины представляют собой биологически активные пептиды, оказывающие плейотропные эффекты на различные типы клеток, главным образом участвуя в поддержании тканевого гомеостаза путем формирования и регуляции защитных реакций организма [6]. Одним из механизмов реализации данных биологических функций цитокинов является поддержание численности иммунных клеток путем модуляции программы их апоптотической гибели [10]. Следует отметить, что влияние обозначенных регуляторов апоптоза на клетки неоднозначно: для одних клеток они выступают в роли индукторов, для других – в роли ингибиторов апоптоза. Характер ответа клетки на действие того или иного цитокина, вероятно, зависит от его концентрации, а также от микроокружения или особенностей

самой клетки-мишени, в первую очередь ее гистогенетического происхождения, стадии дифференцировки, состояния внутриклеточных сигнальных систем [4, 7, 12].

Регуляция апоптоза на молекулярном уровне осуществляется за счет самых разнообразных факторов, обладающих активирующим либо, напротив, ингибирующим влиянием на данный процесс [6]. Существенную роль в системе контроля программированной клеточной гибели играют активные формы кислорода (АФК), осуществляющие регуляцию редокс-состояния клетки и выступающие на разных уровнях сигнальных путей в качестве мессенджеров апоптогенного стимула [8]. Баланс между окисленными и восстановленными молекулами является важным механизмом модуляции клеточной активности. Накопление в клетке сильных окислителей ведет к повышению проницаемости

митохондриальной мембраны [2]. Митохондрии играют одну из ключевых ролей в развитии и регуляции апоптотической программы. На этих органеллах сосредоточено большое количество сигнальных путей, которые образуют достаточно сложную систему взаимодействий в клетке [9, 11, 13]. В матриксе и межмембранном пространстве митохондрий присутствует большое количество таких веществ, как апоптоиндуцирующий фактор, цитохром с, прокаспазы-2, -3, -9, способные прямо или косвенно индуцировать многочисленные изменения, характерные для апоптоза [2].

Накопленные в настоящее время сведения о цитокиноопосредованной гибели клеток в малой степени отражают связь данного пути апоптоза с действием активных форм кислорода. Исследования, направленные на выяснение участия АФК в реализации цитокиноопосредованного апоптоза, позволяют приблизиться к раскрытию механизмов, протекающих в клетках на фоне цитокинового дисбаланса.

В этой связи целью настоящего исследования явилась оценка роли цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза лимфоцитов.

## Материал и методы

В эксперименте *in vitro* использовали лимфоциты, полученные у 24 здоровых доноров (11 мужчин и 13 женщин в возрасте 22–30 лет). Выделенные из венозной крови стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5%  $\text{CO}_2$  в полной культуральной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», г. Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин, либо в полной среде с добавлением проапоптотической дозы рекомбинантного фактора некроза опухоли  $\alpha$  (рФНО- $\alpha$ ). Кроме того, для оценки влияния интерлейкина-2 (ИЛ-2) и -4 (ИЛ-4) на апоптоз лимфоциты инкубировали в чистой среде RPMI-1640 или в среде RPMI-1640 с добавлением проапоптотической дозы рекомбинантных ИЛ-2 (рИЛ-2) и ИЛ-

4 (рИЛ-4). Для подбора проапоптотической дозы в ходе проведения серии экспериментов в культуральную среду добавляли рФНО- $\alpha$ , рИЛ-2 и рИЛ-4 (Invitrogen, США) в дозах от 0,015 до 1 нг/мл. Проапоптотический эффект ФНО- $\alpha$  проявлялся, начиная с дозы 0,05 нг/мл, ИЛ-2 — с дозы 0,10 нг/мл, а ИЛ-4 — с дозы 0,15 нг/мл.

После культивирования клетки ресуспендировали в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный флуоресцин изотиоцианатом (ФИТЦ), и пропидий йодид, инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL (Beckman Coulter, Швейцария).

Уровень наработки активных форм кислорода

в клетках определяли методом проточной цитометрии с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией — дихлорфлуоресцеина диацетата (ДФ-ДА). После культивирования 90 мкл суспензии клеток в концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток на 1 мл переносили в центрифужную пробирку объемом 5 мл для проточного цитометра и добавляли 10 мкл рабочего раствора ДФ-ДА (Sigma, США). Через 20 мин инкубации при температуре 37 °С в пробу вводили 11 мкл 0,2% ЭДТА на 30 мин при температуре 37 °С, затем центрифугировали 1 мин при 1 500 об/мин и удаляли супернатант. Реакцию останавливали 200 мкл лизирующего раствора (0,826 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 г  $\text{NaHCO}_3$ , 3,7 мг ЭДТА-Na на 100 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ), после чего клетки однократно отмывали и ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4). Анализ образцов клеток проводился на проточном цитометре Epics XL с помощью гистограмм FL-1 и соответствующих им окон статистики, содержащих показатели средней геометрической интенсивности свечения меченых клеток.

Регистрацию изменения величины мембранного потенциала митохондрий проводили методом проточной лазерной цитометрии с использованием набора реагентов MitoScreen (BD Pharmigen, США). Суспензию лимфоцитов, содержащую  $1 \cdot 10^6$  клеток, центрифугировали 5 мин при 400g. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл раствора

JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид). Клетки ресуспендировали и инкубировали 10–15 мин при температуре 37 °С, затем дважды отмывали буфером. Окрашенные JC-1 лимфоциты анализировали на проточном цитометре Epics XL.

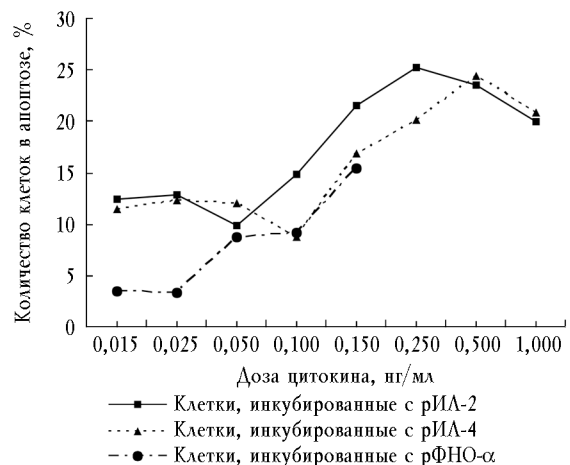
Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для каждого анализируемого показателя вычисляли медиану  $Me$  и первый и третий квартили  $Q_1$ – $Q_3$ . Для определения достоверности различий между независимыми группами использовался непараметрический двусторонний  $U$ -критерий Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

Цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, которые оказывают существенное влияние на процесс пролиферации, дифференцировки и гибели клетки. Выявлена большая группа цитокинов (ИЛ-2, -3, -4, -10, факторы роста), при действии которых запускается эндогенная программа защиты клеток от апоптоза, опосредованная через белки Bcl-2, Bcl-xL и др. Ряд других цитокинов (ФНО, ИЛ-1, -10), напротив, обладают способностью индуцировать апоптоз. Действие цитокинов, вероятно, носит дозозависимый характер, определяется типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки). В зависимости от этого одни и те же цитокины могут проявлять про- и антиапоптотический эффекты, что прежде всего характерно для ФНО, ИЛ-2, -4, -10 и др. [4, 7, 10, 16].

Факт дозозависимого влияния цитокинов на апоптоз активно обсуждается современными исследователями [6, 12, 17]. Для подтверждения теории о дозозависимости эффекта цитокинов на реализацию апоптоза лимфоцитов были использованы различные дозы рекомбинантных ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2 и ИЛ-4 в диапазоне от 0,015 до 1 нг/мл. Проведенное *in vitro* исследование показало, что рФНО- $\alpha$  оказывает свой проапоптотический эффект в отношении лимфоцитарных

клеток в полной питательной среде, начиная с концентрации 0,05 нг/мл ( $p < 0,001$ ) (рисунок, табл. 1). В то время как рИЛ-2 и рИЛ-4 проявляли свое проапоптотическое действие лишь в среде, лишенной ростовых факторов, начиная с концентрации 0,10 ( $p < 0,01$ ) и 0,15 нг/мл ( $p < 0,01$ ) соответственно (рисунок, табл. 2). Полученные данные, вероятно, объясняются тем, что ИЛ-2 и ИЛ-4 действуют только на лимфоциты, получившие какой-либо активационный сигнал (в данном случае – отсутствие ростовых факторов), в то время как ФНО- $\alpha$  действует даже на неактивные лимфоциты [16].



Изменение количества клеток в апоптозе в культуре лимфоцитов крови в зависимости от концентрации рИЛ-2, рИЛ-4 и рФНО- $\alpha$  в инкубационной среде

Таблица 1

Показатели апоптоза лимфоцитов при их инкубации *in vitro* с проапоптотической дозой рекомбинантного ФНО- $\alpha$  ( $Me (Q_1-Q_3)$ )

Показатель	Интактные клетки (полная среда)	Инкубация с рФНО- $\alpha$
Количество лимфоцитов в апоптозе, %	1,69 (1,04–2,08)	8,73 (7,30–12,40) $p < 0,001$
Внутриклеточный уровень АФК, усл. ед.	0,035 (0,008–0,095)	0,079 (0,076–0,326) $p < 0,05$
Количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом, %	2,24 (1,34–2,89)	4,54 (1,76–6,78) $p < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 2:  $p$  — достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями интактных клеток.

Таблица 2

Количество апоптотически измененных клеток, клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, внутриклеточный уровень активных форм кислорода в условиях культивирования лимфоцитов *in vitro* с проапоптотической дозой рекомбинантных ИЛ-2 и ИЛ-4 (Ме (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>))

Показатель	Интактные клетки (бессывороточная среда)	Инкубация с рИЛ-2	Инкубация с рИЛ-4
Количество лимфоцитов в апоптозе, %	9,45 (8,36–10,52)	16,20 (11,75–17,87) $p < 0,01$	16,39 (10,12–21,60) $p < 0,01$
Внутриклеточный уровень АФК, усл. ед.	0,047 (0,028–0,078)	0,078 (0,059–0,170) $p < 0,05$	0,086 (0,040–0,145) $p < 0,05$
Количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом, %	2,25 (1,27–3,66)	7,63 (5,20–8,97) $p < 0,001$	5,00 (4,50–6,22) $p < 0,01$

Механизмы проапоптотического действия цитокинов до конца не изучены. Среди множества факторов, опосредующих эффекты цитокинов, выделяют редокс-состояние клетки-мишени, которое определяется главным образом интенсивностью внутриклеточной продукции АФК, а также участием некоторых митохондриальных факторов [8, 12, 14]. АФК выполняют функцию вторичных посредников при реализации лиганд-рецепторных взаимодействий гормонов, цитокинов, факторов роста и их рецепторов [5]. Кроме того, они изменяют экспрессию ряда генов, в том числе и транскрипционных факторов, участвующих в регуляции клеточного цикла, дифференцировки и запрограммированной гибели клетки [15].

В результате инкубации клеток с рФНО- $\alpha$  внутриклеточная продукция АФК оказалась практически вдвое ( $p < 0,05$ ) выше соответствующего показателя в интактных лимфоцитах. Аналогичным оказалось влияние рИЛ-2 и рИЛ-4 ( $p < 0,05$ ) на уровень АФК в клетке (табл. 1 и 2).

Рассматривая механизмы участия АФК в реализации апоптоза, особое внимание следует уделить митохондриям. Эти органеллы являются не только мишенями действия АФК, но и одним из главных источников их образования в клетке, концентрируя в себе большую часть окислительных путей метаболизма, содержат многочисленные редокс-переносчики и центры, потенциально способные к одноэлектронному

восстановлению кислорода до радикала супероксид-аниона — предшественника других АФК [3, 14].

При проведении цитометрической оценки лимфоцитов после их инкубации с рФНО $\alpha$ , рИЛ-2 и рИЛ-4 в проапоптотической дозе количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом достоверно ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно) возрастало по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре (см. табл. 1 и 2). Известно, что к снижению  $\Delta\psi$  приводит открытие митохондриальных пор из-за смещения равновесия активных форм белков семейства Bcl-2 в сторону проапоптотических протеинов [11, 13]. При этом происходит высвобождение в цитозоль апоптозиндуцирующего фактора, цитохрома c и некоторых прокаспаз. Активация каспазы-9 запускает инициацию каспазы-3 и -7, которые, в свою очередь, расщепляют различные белки, приводя к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза [2, 9, 13].

## Заключение

Подводя итог полученным результатам исследования, следует отметить, что проапоптотические эффекты цитокинов носят дозозависимый характер и определяются состоянием внутриклеточных сигнальных систем. Важными внутриклеточными участниками апоптотической программы являются активные формы кислорода. Увеличе-

ние продукции АФК при цитокининдуцированном апоптозе сопряжено со снижением трансмембранного митохондриального потенциала, что свидетельствует о нарушении редокс-статуса клетки и заинтересованности митохондриального пути в реализации данного вида клеточной смерти.

Стало ясно, что с позиции нарушения апоптоза можно объяснить развитие многих заболеваний человека, поскольку дисбаланс между пролиферацией клеток и запрограммированной клеточной смертью ведет к патологическим изменениям органов и тканей. Цитокины являются одним из основных факторов, оказывающих регулирующее влияние на эти процессы. Нарушение цитокиновой сети выступает патогенетическим звеном ряда заболеваний, сопряженных с дисрегуляцией пролиферации и апоптоза, в связи с чем встает вопрос о поиске новых внутриклеточных мишеней и целесообразности использования цитокиновых молекул или применения антагонистов к ним в терапевтических целях.

*Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России» на 2007–2012 гг. (ГК № 02.512.12.0013 и ГК № 02.512.11.2285), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-12150\_офи, 09-04-99025\_p\_офи).*

#### Литература

1. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 246–264.
2. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в запрограммированной гибели клетки: различные механизмы гибели // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 284–293.
3. Зоров Д.Б., Банников С.Ю., Белоусов В.В. и др. Друзья или враги: активные формы кислорода и азота // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 265–272.
4. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю. и др. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса // Бюл. эксперим. медицины и биологии. 2008. №3. С. 251–254.
5. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 158–174.
6. Потапов М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237–243.
7. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Литвинова Л.С. и др. Влияние рекомбинантных форм интерлейкинов-5, -3 и эотаксина на апоптоз эозинофильных гранулоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. Т. 143. № 4. С. 370–373.
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю. и др. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 6. С. 710–718.
9. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образоват. журн. 2001. Т. 7. № 6. С. 4–10.
10. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1998. № 2. С. 38–48.
11. Adams J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis // Genes & Development. 2003. Vol. 17. P. 2481–2495.
12. Callard R., George A.J.T., Stark J. Cytokines, chaos, and complexity // Immunity. 2003. Vol. 11. P. 507–513.
13. Dragovich T., Rudin C.M., Thompson C.B. Signal transduction pathways that regulate survival and cell death // Oncogene. 1998. Vol. 17. P. 3207–3213.
14. Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling // Biochimie. 2002. № 84. P. 131–141.
15. Jackson M.J., Papa S., Bruckdorfer J. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function // Mol. Aspects Med. 2002. № 23. P. 209–285.
16. Lenardo M., Chan K.M., Hornung F. Mature T-lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment // Annu Rev Immunol. 1999. № 17. P. 221–253.
17. Litvinova L.S., Ryazantseva N.V., Novitskii V.V. Cytokine mediated apoptosis of granulocyte eosinophils in expressed blood eosinophilia // Cell and Tissue Biology. 2008. Vol. 2. № 1. P. 33–37.

Поступила в редакцию 03.04.2009 г.

Утверждена к печати 28.04.2009 г.

#### Сведения об авторах

Чечина О.Е. — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Биктасова А.К. — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др.      Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза**

*Сазонова Е.В.* – аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

*Жукова О.Б.* – д-р мед. наук, доцент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

*Прохоренко Т.С.* – старший лаборант кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

*Крат И.В.* – канд. мед. наук, врач-лаборант ГУЗ «ФМБА КБ № 81» (г. Северск), соискатель кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

*Часовских Н.Ю.* – канд. мед. наук, ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

*Новицкий В.В.* – д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

*Рязанцева Н.В.* – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**Для корреспонденции**

**Чечина Ольга Евгеньевна**, тел. 8-905-089-2137, e-mail: olga\_chechina@mail.ru