

РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ IL-8, IL-10 И АПОПТОЗА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

Евгения Викторовна КАЙГОРОДОВА, Елена Григорьевна СТАРИКОВА, Ольга Евгеньевна ЧЕЧИНА, Наталия Юрьевна ЧАСОВСКИХ, Татьяна Васильевна ЖАВОРОНОК, Асель Кинжибулатовна БИКТАСОВА, Елена Викторовна САЗОНОВА, Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА, Вячеслав Викторович НОВИЦКИЙ

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава
634057, г. Томск, Московский тракт, 2

Проведено исследование продукции интерлейкинов 8 и 10 и реализации апоптотической программы мононуклеарными лейкоцитами крови в условиях окислительного стресса. Возрастание внутриклеточного содержания активных форм кислорода (АФК) и продукции интерлейкина 8 мононуклеарными лейкоцитами в случае индукции окислительного стресса 1 mM H₂O₂ *in vitro* у больных пневмонией и пациентов с острым аппендицитом сопровождается увеличением числа апоптотических клеток.

Ключевые слова: окислительный стресс, АФК, апоптоз, IL-8, IL-10.

Интенсификация окислительных реакций при различных патологических состояниях может оказывать влияние на процессы реализации апоптоза (как в сторону активации, так и в сторону ингибирования), выступая в качестве патогенетического фактора развития сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, воспалительных и нейродегенеративных процессов. Особый интерес исследователей в этом плане привлекает роль изменений редокс-статуса клетки в модуляции ее программированной гибели [1, 2]. Особенности функционирования отдельных систем инициации летальной программы (вне- и внутриклеточных) в условиях изменения окислительного метаболизма требуют детального изучения. Показано, что апоптотический сигнал может исходить от рецепторов для цитокинов и глюкокортикоидов [3]. Ряд цитокинов (интерферон γ , фактор некроза опухолей TNF, β -токоферол, IL-1, IL-8) способны инициировать запуск летальной программы клеток [4, 5]. Другие цитокины (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, факторы роста) предупреждают реализацию апоптотической программы через усиление функций белков Bcl-2 и Bcl-x_L [2, 3]. В ряде случаев возможно как про-, так и антиапоптогенное действие цитокинов в зависимости от типа и функционального состояния

клеток, обусловленного в том числе их редокс-статусом [2, 5, 6]. В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка влияния окислительного стресса на продукцию IL-8 и IL-10, обладающих про- и антиапоптотическими эффектами соответственно и на реализацию программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов крови.

Материал и методы

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная у 18 практически здоровых доноров, 14 пациентов с внебольничной пневмонией и 13 больных с острым аппендицитом (исследование проводили до лечения, на пике острого воспалительного процесса). Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови путем центрифугирования на слое фиколла (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077, затем клетки ресуспендировали в полной питательной среде (90 % RPMI-1640, 10 % инактивированной при 56 °C в течение 30 мин эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, 2 мМ/мл NEPES (Flow, Великобритания)). Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °C и 5 % CO₂. Окислительный стресс индуцировали добавлением в клеточные культуры 1 mM перекиси водорода.

Кайгородова Е.В. — к.м.н., докторант кафедры патофизиологии, e-mail: zlobinae@mail.ru

Старикова Е.Г. — к.м.н., докторант кафедры патофизиологии

Чечина О.Е. — к.м.н., докторант кафедры патофизиологии, e-mail: olga_chechina@mail.ru

Часовских Н.Ю. — к.м.н., ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины, cnil@mail.ru

Жаворонок Т.В. — к.м.н., докторант кафедры патофизиологии

Биктасова А.К. — аспирант кафедры патофизиологии, e-mail: asel_1983@mail.ru

Сазонова Е.В. — аспирант кафедры патофизиологии, e-mail: cnil@mail.ru

Рязанцева Н.В. — д.м.н., проф., зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины, e-mail: ryazan@mail.tomsknet.ru

Новицкий В.В. — д.м.н., проф., зав. кафедрой патофизиологии, академик РАМН, e-mail: office@ssmu.net.ru

Уровень продукции внутриклеточных АФК определяли методом проточной лазерной цитометрии (Epics XL (Beckman Coulter, Франция)) с помощью дихлорфлуоресцеина диацетата (DCF-DA) (Sigma Aldrich, США). Для характеристики уровня АФК в мононуклеарных лейкоцитах использовали показатель, выражающийся в условных единицах и соответствующий интенсивности свечения на клетку.

Оценку реализации апоптоза проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V (Catlag, США) и TUNEL-методом (Webstain, США) согласно инструкциям фирм-производителей. В первом случае использовали свойство сродства аннексина к мембрано-связанному фосфатидилсерину, анализировали параметры зеленой флуоресценции (FITC – 530 нм) в гейтах мононуклеарных клеток; во втором – способность фермента TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) специфически распознавать 3'-ОН конец хромосомного разрыва и присоединять к нему светящийся зонд, что регистрировалось при флуоресцентном микрокопировании.

Концентрацию IL-8 и IL-10 в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией к наборам, содержащим моноклональные антитела к IL-8 или IL-10 человека (Biosource, США) на микропланшетном фотометре Multiscan EX (ThermoLabSistems, Финляндия).

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с помощью критерия Колмогорова –

Смирнова. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 – Q_3). При анализе использовали метод корреляционного анализа Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные литературы свидетельствуют, что большое число патологий (в том числе воспалительные процессы различной этиологии) сопряжено с развитием окислительного стресса [7, 8]. Действительно, проведенная нами оценка уровня внутриклеточных АФК выявила его увеличение в мононуклеарных лейкоцитах крови у пациентов с внебольничной пневмонией и у больных острым аппендицитом по сравнению с таковым в клетках здоровых доноров (табл.). Одним из важнейших редокс-зависимых процессов в клетках является апоптоз, что подтверждено результатами наших исследований [9]. Относительное количество аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов в культурах клеток пациентов с острым аппендицитом и внебольничной пневмонией, а также у здоровых лиц при индукции окислительного стресса 1 mM H_2O_2 *in vitro*, превышало контрольную величину, о чем свидетельствовали результаты лазерной проточной цитофлуориметрии (табл.). Показатели, полученные с помощью аннексинового теста, были подтверждены исследованием с помощью TUNEL-метода (11,34 (9,45–12,45) % при остром воспалении против 1,57 (1,11–2,36) % в контроле).

Таблица

Уровень активных форм кислорода, количество апоптотических клеток в общей популяции мононуклеарных лейкоцитов, содержание IL-8 и IL-10 в супернатантах культур в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении ($Me(Q_1-Q_3)$)

Условия культивирования клеток	Уровень АФК в клетке, у.е.	Количество аннексин-положительных клеток, %	Содержание IL-8, нг/мл	Содержание IL-10, нг/мл
Интakтная культура мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров	0,28 (0,19–0,35)	1,57 (1,02–2,14)	131,0 (121,4–130,4)	324,3 (223,3–353,4)
Инкубирование клеток здоровых доноров с 1 mM H_2O_2	0,55 (0,49–0,63)*	11,08 (10,42–14,62)*	141,0 (137,0–145,0)*	329,2 (198,6–353,8)
Интakтная культура клеток больных острым аппендицитом	0,48 (0,45–0,52)*	10,39 (9,74–10,89)*	159,0 (156,0–165,0)*, **	155,7 (90,2–267,2)
Интakтная культура клеток больных внебольничной пневмонией	0,51 (0,47–0,55)*	10,81 (8,72–11,25)*	160,0 (158,0–162,0)*, **	288,5 (183,3–287,5)

Примечание: * – отличие от аналогичных показателей в контрольной группе достоверно при $p < 0,001$; ** – отличие от аналогичных показателей в эксперименте с 1 mM H_2O_2 достоверно при $p < 0,05$.

Одним из наиболее изученных путей запуска апоптоза является внешний (рецепторный) путь, позволяющий элиминировать клетки с определенной специфичностью при воздействии соответствующих экзогенных факторов. При этом в качестве модулятора апоптоза могут выступать различные цитокины. Одни из них обладают проапоптотическим, другие — антиапоптотическим эффектом, а также проявляют двойственный эффект в зависимости от типа клеток и сопутствующих условий [2–4]. Ранее нами было показано, что механизмы модуляции апоптоза при нарушении баланса окислительного метаболизма связаны с вовлечением пути инициации программированной клеточной гибели, опосредованного рецепторами к TNF [1]. В настоящем исследовании оценивали продукцию IL-8 и IL-10 (про- и противовоспалительного цитокинов) при изменении редокс-статуса клеток.

Интерлейкин 8 — NAP-1 (активирующий нейтрофилы пептид-1), NAF (фактор активации нейтрофилов), GCF (хемотактильный фактор гранулоцитов), NCF (хемотактильный фактор нейтрофилов) — синтезируется различными типами клеток (моноцитами, нейтрофилами, эндотелиальными клетками, митоген-стимулированными Т-лимфоцитами) и является провоспалительным цитокином. К числу основных биологических эффектов IL-8 относятся индукция хемотаксиса нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и других иммунных клеток, усиление ангиогенеза *in vivo* и *in vitro*, а также индукция апоптоза [10]. Полученные результаты свидетельствуют о статистически достоверном увеличении продукции интерлейкина 8: с 131,0 (121,4–130,4) нг/мл в контроле до 141,0 (137,0–145,0) нг/мл в культурах клеток, подвергнутых воздействию H_2O_2 в концентрации 1 мМ, а также до 160,0 (158,0–162,0) нг/мл и 159,0 (156,0–165,0) нг/мл — в культурах клеток у пациентов с пневмонией и острым аппендицитом соответственно (табл.). Влияние дисбаланса окислительного метаболизма на продукцию IL-8 мононуклеарными лейкоцитами подтверждалось наличием положительной корреляционной связи между повышением уровня АФК и возрастанием содержания интерлейкина 8 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при экспериментальном окислительном стрессе ($r = 0,72$, $p < 0,05$) и острых воспалительных заболеваниях ($r = 0,61$, $p < 0,05$). Положительная корреляционная связь была обнаружена также между повышением уровня IL-8 и увеличением количества апоптотически измененных клеток при экспериментальном окислительном стрессе ($r = 0,63$, $p < 0,05$) и острых воспалительных заболеваниях ($r = 0,52$, $p < 0,05$). Поскольку повышенный уровень IL-8 ассоциировался с увеличением числа аннексин-положительных клеток, можно предположить, что возрастание продукции данного цитокина является одним из элементов активации апоптотических механизмов в мононуклеарных лейкоцитах,

отмечаемой нами при окислительном стрессе. Действительно, в условиях окислительного стресса, при хронических и острых воспалительных состояниях, под воздействием бактериальных эндотоксинов и цитокинов (главным образом TNF α и IL-1) происходит индукция продукции IL-8 [10–12].

С другой стороны, в качестве фактора, ингибирующего эффекты лимфоцитарных и макрофагальных воспалительных цитокинов, выступает IL-10 — противовоспалительный медиатор. Он стимулирует в моноцитах экспрессию растворимых рецепторов TNF α (sTNF) (естественных ингибиторов TNF α) [13] и увеличивает продукцию антагониста рецептора IL-1 (IL-1Ra), ингибирующего связывание IL-1 с мембранным рецептором [5, 14]. IL-10 продуцируется лимфоцитами Th-2 типа, В-лимфоцитами, моноцитами и эпителиальными клетками [4, 8, 13]. Показано, что данный цитокин способен подавлять апоптоз, в частности, В-лимфоцитов и активированных Т-клеток [4, 6].

По полученным нами результатам, в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при инкубировании клеток с 1 мМ H_2O_2 содержание IL-10 составило 329,2 (198,6–353,8) нг/мл, что соответствовало контрольным значениям [324,3 (223,3–353,4) нг/мл]. Оценка содержания IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у пациентов с острым аппендицитом и внебольничной пневмонией выявила аналогичные закономерности (табл.). При проведении корреляционного анализа не обнаружено связи между продукцией IL-10 и увеличением числа аннексин-положительных клеток при экспериментальном окислительном стрессе и при остром воспалении. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии изменений содержания IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе *in vitro* и при острых воспалительных заболеваниях.

Таким образом, модуляция апоптоза при окислительном стрессе связана с вовлечением внешнего пути инициации программированной клеточной гибели, сопряженным с изменением соотношения продукции IL-8 и IL-10 (в сторону преобладания проапоптотического цитокина) мононуклеарными лейкоцитами.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № П1203), Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» ГК № 02.512.11.2285, РФФИ (грант 09-04-99025), гранта Президента РФ № 02.120.11.3842-МД.

Список литературы

1. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю. и др. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях

окислительного стресса // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. (3). 251–254.

Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Chasovskikh N.Yu. *et al.* Modulation of mononuclear cells apoptosis under oxidative stress conditions // Byul. experim. boilogii i meditsiny. 2008. (3). 251–254.

2. Октябрский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. 72. (2). 158–174.

Oktyabrsky O.N., Smirnova G.V. Redox-regulation of cellular function // Biokhimiya. 2007. 72. (2). 158–174.

3. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. Apoptosis signaling // Annu. Rev. Biochem. 2000. 69. 217–245.

4. Рубцова И.Е., Лебедева И.Е. Действие моноклональных антител к интерлейкину 10 на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов зависит от уровня апоптоза в культурах моноклеарных клеток пуповинной крови новорожденных // Иммунология. 2004. (1). 16–20.

Rubtsova I.E., Lebedeva I.E. Action of monoclonal anticorps to interleukin 10 on T-lymphocyte's proliferative response depends on apoptosis level in cultures of mononuclear cells of umbilical cord blood of newborns // Immunologiya. 2004. (1). 16–20.

5. de Waal Malefyt R., Figdor C.G., Huijbens R. *et al.* Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes: comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10 // J. Immunol. 1993. 151. 6370–6372.

6. Pawelec G., Hambrecht A., Rehbein A. *et al.* Interleukin-10 protects activated human T lymphocytes against growth factor withdrawal-induced cell death // Cytokine. 1996. 8. (12). 877–881.

7. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.

Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshchikova E.B. Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects. M.: Nauka/Interperiodika, 2001. 343 p.

8. Игонин А.А., Кукес В.Г., Пальцев М.А. Сепсис: молекулярные механизмы системного воспаления в

качестве модели для изучения перспективных терапевтических мишеней // Молекулярная медицина. 2004. (2). 3–11.

Igonin A.A., Kukes B.G., Pal'tsev M.A. Sepsis: molecular mechanisms of system inflammation as model for study on perspective therapeutic targets // Molekularnaya meditsina. 2004. (2). 3–11.

9. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю. и др. Роль митоген-активируемых протеинкиназ JNK (с-Jun NH2-terminal kinases) и p38 в регуляции апоптоза моноклеаров крови в условиях окислительного стресса *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. (5). 505–509.

Ryazantseva N.V., Novitskii V.V., Chasovskikh N.Yu. *et al.* Role of mitogen-activated protein kinases JNK(c-Jun NH2-terminal kinases) and p38 in regulation of mononuclear cells apoptosis under oxidative stress *in vitro* // Byul. experim. boilogii i meditsiny. 2008. (5). 505–509.

10. Hack C. Interleukine 8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators // Infect. Immun. 1992. 60. 2835–2842.

11. Aydin M., Ozkok E., Ozturk O. *et al.* Relationship between interleukin-8 and the oxidant-antioxidant system in end-stage renal failure patients // Exp. Clin. Transplant. 2007. 5. (1). 610–613.

12. Lakshminarayanan V., Drab-Weiss E.A., Roebuck K.A. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells // J. Biol. Chem. 1998. 273. (49). 32670–32678.

13. Foey A.D., Parry S.L., Williams L.M. *et al.* Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases // J. Immunol. 1998. 160. (2). 920–928.

14. Jenkins J.K., Malyak M., Arend W.P. The effects of interleukin-10 (IL-10) on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils // Lymphokine Cytokine Res. 1994. 13. 47–49.

REDOX-DEPENDENT CHANGES IN PRODUCTION IL-8, IL-10 AND APOPTOSIS OF MONONUCLEAR LEUCOCYTES

Evgenia Victorovna KAIGORODOVA, Elena Grigorevna STARIKOVA, Olga Evgenievna CHECHINA,
Natalia Yurievna CHASOVSKIKH, Tatiana Vasilevna ZHAVORONOK, Acel Kingibulatovna BIKTASOVA,
Elena Victorovna SAZONOVA, Natalia Vladimirovna RYAZANTSEVA, Vyacheslav Victorovich NOVITSKII

*Siberian State Medical University
634057, Tomsk, Moskovskii tr., 2*

Interleukins 8 and 10 production and apoptosis implementation by mononuclear leucocytes of peripheral blood under oxidative stress condition was investigated. Increase in intracellular ROS content and interleukin 8 production by mononuclear leucocytes in case of induction oxidative stress by 1 mM H₂O₂ *in vitro*, in patients with pneumonia and acute appendicitis is accompanied by increasing of apoptotic cells number.

Key words: oxidative stress, ROS, apoptosis, IL-8, IL-10.

Kaigorodova E.V. – candidate of medical sciences, doctoral student of the chair for pathophysiology,
e-mail: zlobinae@mail.ru

Starikova E.G. – candidate of medical sciences, doctoral student of the chair for pathophysiology,
e-mail: cnil@mail.ru

Chechina O.E. – candidate of medical sciences, doctoral student of the chair for pathophysiology,
e-mail: olga_chechina@mail.ru

Chasovskikh N.Y. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for fundamental bases
of clinical medicine, e-mail: strateg@ssmu.ru

Zhavoronok T.V. – candidate of medical sciences, doctoral student of the chair for pathophysiology,
e-mail: tavaza@ngs.ru

Biktasova A.K. – post-graduate student of the chair for pathophysiology, e-mail: asel_1983@mail.ru

Sazonova E.V. – post-graduate student of the chair for pathophysiology, e-mail: cnil@mail.ru

Ryazantseva N.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for fundamental bases
of clinical medicine, e-mail: ryazan@mail.tomsknet.ru

Novitskii V.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair
for pathophysiology academician of RAMS, e-mail: office@ssmu.net.ru