Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
Институт клинической иммунологии

ИММУННАЯ СИСТЕМА: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ В НОРМЕ, ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ, ПРИ ИММУНОПАТОЛОГИИ

Материалы 5-й отчетной сессии
ИКИ СО РАМН

Под редакцией:
замдиректора ИКИ СО РАМН по научной работе
члена-корреспондента РАМН, профессора В. И. Коненкова

Scientific report 2000
Institute of clinical immunology
Siberian branch of Russian Academy of Medical Scinces

Новосибирск 2000

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗЫ В ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ТИМОЦИТОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

Персиянова В. О., Вольский Н. Н., Киселев С. В.

Вызываемая глюкокортикоидными гормонами (ГК) активация апоптоза тимоцитов является существенным элементом реакции стресса и играет большую роль в физиологическом влиянии этих гормонов на иммунную систему. Обнаруженное нами ранее прямое стимулирующее действие ГК на НАД(Ф)Н-оксидазу – фермент, генерирующий супероксидный радикал, – позволило предположить, что ГК-индуцированный апоптоз тимоцитов опосредуется увеличением концентрации перекиси водорода в клетках в результате активации этого фермента. Данная гипотеза была подтверждена экспериментами, в которых обнаружен защитный эффект каталазы, удаляющей H_2O_2 из среды инкубации клеток: добавление каталазы (100 ед/мл) резко снижало интенсивность апоптоза тимоцитов, индуцированного дексаметазоном. В следующей серии экспериментов было исследовано влияние ингибиторов НАД(Ф)Н-оксидазы на ГК-индуцированный апоптоз лимфоцитов, интенсивность которого измерялась на проточном цитофлуориметре стандартным методом с использованием флуоресцеиндиацетата и пропидиумиодида. Показано, что специфический ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы дифениленийодониум дозозависимо ингибирует апоптоз тимоцитов мыши, вызванный добавлением дексаметазона: при дозе ингибитора 2 мкМ количество апоптозных клеток через 6 часов инкубации с дексаметазоном составляло лишь 25–30% от их числа, обнаруживаемого в пробах, к которым был добавлен только гормон (без ингибитора). Добавление к клеткам кромогликата натрия (кромолина), ши-

роко используемого как лекарственный препарат при лечении бронхиальной астмы и способного (по литературным данным и результатам наших экспериментов) ингибировать активность НАД(Ф)Н-оксидазы, также защищало тимоциты от гибели, хотя эффективность этого вещества была меньшей по сравнению с действием дифениленйодониума (по данным предварительных экспериментов, в дозе 50 мкМ кромогликат на 40–50% уменьшает количество апоптозных клеток в культуре, инкубированной с дексаметазоном). Результаты этих экспериментов подтверждают наше предположение о том, что активация НАД(Ф)Н-оксидазы глюкокортикоидами, приводящая к накоплению H_2O_2, является ключевым моментом в развитии ГК-индуцированного апоптоза лимфоцитов, и этот факт необходимо учитывать при фармакологическом применении ГК и при объяснении механизмов их физиологического действия на иммунные реакции.

KEY ROLE OF NAD(P)H OXIDASE IN THE THYMOCYTE APOPTOSIS INDUCED BY GLUCOCORTICOID HORMONES

Persianova V. O., Volsky N. N., Kisselev S. V.

The essential component of stress reaction is the induced by glucocorticoid hormones (GC) thymocyte apoptosis. This process plays an important role in the physiological influence of GC on the immune system. Previously we found direct GC action on the O_2^- generating enzyme NAD(P)H oxidase. The investigation of this effect led us to propose that GC-induced thymocyte apoptosis is mediated by the hydrogen peroxide which accumulates in cells after activation of this enzyme. We obtained an experimental evidence confirming this supposition. Addition of catalase (100 U/ml) to thymocyte incubation medium eliminates H_2O_2 and profoundly suppresses an intensity of GC-induced cell apoptosis. In another set of experiments we investigated the influence of NAD(P)H oxidase inhibitors on GC-induced lymphocyte apoptosis. The magnitude of apoptosis has been estimated by standard method with fluorescein diacetate and propidium iodide on the flow cytofluorimeter. It has been shown that a specific NAD(P)H oxidase inhibitor diphenylene iodonium suppresses the dexamethazone-induced apoptosis of murine thymocytes in dose-dependent manner. The number of apoptotic cells in the probes incubated for 6 hours with 2 μM diphenylene iodonium was only 25–30% (vs

number of apoptotic cells in the probes incubated without the inhibitor). We have also shown that sodium cromoglycate (cromoline) is capable of protecting thymocyte against GC-induced apoptosis. Cromoline is widely used as medicine in the bronchial asthma treatment. According to literary data and results of our experiments it has the property of suppressing NAD(P)H oxidase activity. Our preliminary experiments showed that adding of cromoline (50 μM) to incubation medium reduces the number of apoptotic cells by 40–50% (vs number of apoptotic cells incubated with dexamethazone only). These results support our assumption that GC-stimulated NAD(P)H oxidase activity which leads to accumulation H_2O_2 in cells, plays a key role in the development of GC-induced lymphocyte apoptosis. This fact should be taken into account at pharmacological use of GC and at explanation of physiological mechanisms of its effects on the immune reactions.