

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ВЛИЯНИЕ ЛАДАСТЕНА НА АКТИВАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННУЮ ЭКСПРЕССИЮ FAS-РЕЦЕПТОРА НА Т-ЛИМФОЦИТАХ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К FAS-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ

Ю. В. Вахитова^{1,3}, М. Х. Салимгареева³, С. В. Сибиряк²,
Н. Н. Курчатова², С. Б. Середенин¹

Исследовано влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию Fas-рецептора и чувствительность лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу, а также на экспрессию митоген-активируемых протеинкиназ ERK1/ERK2. Показано, что ладастен в диапазоне концентраций 0,1 – 1 мкМ проявляет комитогенный эффект при TCR-опосредованной стимуляции Т-лимфоцитов периферической крови человека, что сопровождается увеличением фосфорилированной формы MAP-киназы ERK2. Ладастен практически не изменяет активационно-индуцированную экспрессию Fas на Т-лимфоцитах, но у чувствительных к Fas-зависимому апоптозу доноров снижает интенсивность Fas-зависимого апоптоза. Сделан вывод, что в основе иммунопротекторного эффекта препарата может лежать снижение интенсивности Fas-зависимого апоптоза.

Ключевые слова: ладастен, ERK1/2, pERK1/2, Fas-зависимый апоптоз, комитогенный эффект

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы нарастает интерес к поиску способов фармакологической коррекции нарушенной иммунореактивности путем воздействия на механизмы регуляции пролиферативной активности лимфоцитов и их программируемой клеточной гибели, в частности, автономного и активационно-индуцированного апоптоза [6]. Это наиболее актуально в условиях воздействия на организм экстремальных факторов окружающей среды. В эксперименте и клинических исследованиях аргументировано усиление механизмов Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов при стрессе, воздействии токсичных ксенобиотиков [16, 18]. Усиление апоптоза лимфоцитов сопровождают тяжелые инфекционные и вирусные заболевания [7, 10, 17]. Преобладание апоптотических процессов (негативной активации) приводит к нарушению баланса между клональной экспансией лимфоцитов и их апоптозом и развитию иммунодефицитных состояний.

Особенно ценно, если препарат сочетает основной фармакологический эффект (стресс-протекторный, актопротекторный) и иммуномодулирующую активность. Таким свойством обладает производное бромадаммантана – ладастен, иммунокорректирующий эффект которого продемонстрирован в экспериментальных и

клинических условиях [1, 3, 5]. В предыдущем исследовании установлено, что ладастен, не обладая собственным митогенным эффектом на лимфоциты человека в 72-часовых культурах, тем не менее проявлял слабый комитогенный эффект при TCR-опосредованной стимуляции Т-лимфоцитов [2], что закономерно сопровождалось некоторым нарастанием интенсивности активационного апоптоза клеток. В то же время ладастен ингибировал апоптоз активированных клеток, индуцированный повреждением ДНК или прооксидантным воздействием (перекись водорода). Основным механизмом регуляции программируемой клеточной гибели активированных лимфоцитов является апоптоз, реализуемый через рецепторную систему Fas-рецептор/Fas-лиганд (Fas/FasL) [13]. В настоящей работе изучено влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию Fas рецептора и чувствительность лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу, а также на экспрессию митоген-активируемых протеинкиназ ERK1/ERK2 (extracellular signal regulated kinase).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на культурах лимфоцитов периферической крови здоровых доноров-добровольцев. Все доноры были поставлены в известность о проводимом исследовании и дали согласие на участие в нем.

Мононуклеары получали из периферической венозной крови стандартным методом градиентного центрифугирования. Клетки дважды отмывали средой

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ, Уфа, 450075, ул. Р. Зорге, 67/1.

³ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054, Пр. Октября, 69.

RPMI-1640 (“Sigma”, St. Louis, Mo). Полученную взвесью клеток ресуспендировали в полной среде культивирования (среда RPMI-1640, 0,3 мкг/мл *L*-глутамина, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина сульфата) в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл и переносили в 24-луночные планшеты для культивирования (Costar). Лимфоциты культивировали 72 ч (37 °С, 5 % CO₂). В качестве Т-клеточного митогена использовали моноклональные антитела против CD3-рецептора (αCD3 МКА, 2,5 мкг/мл, клон IC0-90, ВОИЦ РАМН).

Ладастен растворяли в ДМСО (ICN) и добавляли в культуры одновременно с митогеном в конечной концентрации 0,1 – 1,0 мкМ. В контрольные культуры добавляли только ДМСО (конечная концентрация не более 0,4 %).

Оценку экспрессии Fas рецептора (CD95) осуществляли стандартным иммунофлуоресцентным методом. После окончания инкубации лимфоциты отмывали раствором CellWash (BD), ресуспендировали в этом же растворе и окрашивали FITC-мечеными МКА против CD3 рецептора (Caltag) и PE-мечеными МКА против CD95 рецептора (Caltag) согласно протоколу, предложенному изготовителем антител. После окрашивания клетки подвергали проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur (BD). Полученные данные анализировали в рамках программного обеспечения CellQuest (BD).

Апоптоз оценивали флуориметрическим методом, определяя суммарную активность “терминальных” каспаз 3, 7, 10 (Cs-3,7,10) в лизатах лимфоцитов, используя стандартный набор реагентов FuogAce Apoptain Assay Kit (BIO-RAD). Интенсивность флуоресценции регистрировали на флуориметре VersaFluor 1.3 (BIO-RAD) и ферментативную активность (скорость расщепления флуорогенного субстрата Ac-DEVD-AFC) выражали в условных единицах флуоресценции — изменение флуоресценции (dS) за единицу времени (dt).

Для индукции апоптоза лимфоциты после культивирования отмывали, ресуспендировали в свежей среде без сыворотки и обрабатывали мышинными МКА против Fas рецептора человека (500 нг/10⁶ лимфоцитов, DX-2 клон, IgG1, PharMingen, BD) в течение 5 ч. В качестве параллельных контрольных (неиндуцированных) культур использовали клетки, обработанные мышинными IgG1.

При определении экспрессии нефосфорилированных и фосфорилированных форм митоген-активируемых киназ (ERK1/ERK2) клетки после инкубации центрифугировали при 1400 об/мин 15 мин (B 3.11, Gouan, Франция), промывали в физиологическом растворе и считали в камере Горяева. Осажденные клетки (10⁷) суспендировали в лизирующем буфере, содержащем 10 мМ трис, pH 7,4; 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1 мМ NaF, 20 мМ Na₄P₂O₇, 2 мМ NaVO₄, 0,1 % SDS, 0,5 % дезоксихолат Na, 1 % тритон — X 100,

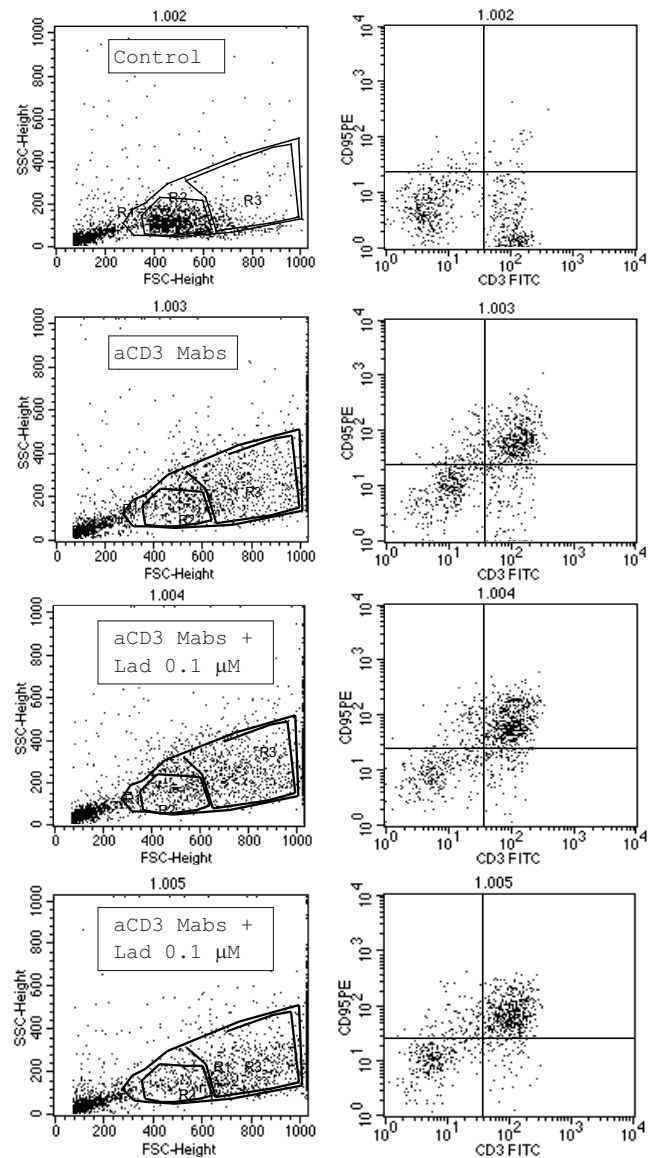


Рис. 1. Цитофлюорограммы, иллюстрирующие влияние ладастена на экспрессию Fas рецептора (CD95) на активированных αCD3 МКА CD3+ Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров.

Левые цитофлюорограммы: параметры переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния анализируемых клеток. Правые цитофлюорограммы: экспрессия CD95 на Т лимфоцитах. По оси абсцисс — (FL1) — CD3+ лимфоциты; по оси ординат — (FL2) — CD95+ лимфоциты.

10 % глицерин, 1 мМ PMSF, 60 мкг/мл аprotинина, 10 мкг/мл леупептина, 1 мкг/мл пепстатина. Затем инкубировали в течение 10 мин, полученный материал замораживали – размораживали и центрифугировали 10 мин, при 12000 g. Фракционирование белков проводили методом электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия в модификации Лэммли [14]. Все дорожки содержали одинаковое количество белка суммарного клеточного лизата. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для влажного переноса с использованием буфера, содержащего

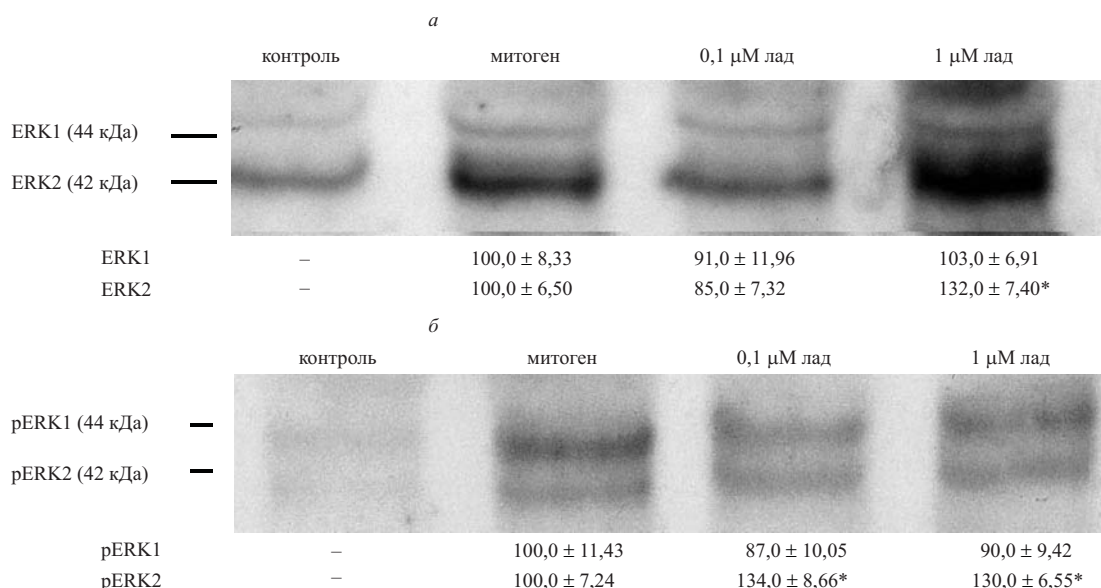


Рис. 2. Экспрессия митогенактивируемых протеинкиназ ERK 1/2 (*a*) и pERK 1/2 (*б*) в Т-лимфоцитах периферической крови человека под действием разных концентраций ладастена (в % к уровню активации митогеном).

25 мМ трис, 192 мМ глицина, 20 % метанола, pH 8,3. Оборудование производства BIO-RAD (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell) и все операции выполняли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Для снижения неспецифической сорбции антител мембраны инкубировали в 0,2 % обезжиренном молоке, разведенном в TBS (20 мМ Tris, pH 7,4; 0,9 % NaCl) и содержащем 0,1 % твин — 20, в течение 1 ч, после чего промывали мембрану в TBS-T и инкубировали в растворе первых антител, разведенном в 0,2 % TBS-T. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела (BIOSOURCE, USA) на фосфорилированные (pERK 1,2) и нефосфорилированные формы протеинкиназ, в разведении 1:2000. После отмывки от первичных антител (3 раза по 5 мин в TBS-T) мембрану инкубировали 1 ч в растворе вторых антител, разведенных в 0,2 %-ном молоке в TBS-T (разведение 1:6000). В качестве вторых антител использовали иммуноглобулины козы, конъюгированные авидин фосфатазой, полученные против иммуноглобулинов кролика. Белки выявляли методом усиления хемилюминесценции (ECL) согласно инструкции фирмы-производителя (Ummun-Star Chemiluminescent Protein Detection Systems, BIO-RAD).

Статистический анализ осуществляли стандартными методами вариационной статистики в рамках программного обеспечения Statistica for Windows (версия 5.0). Различия считали существенными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в предшествующих экспериментах ладастен проявлял слабый комитогенный эффект, что было вы-

явлено при анализе параметров переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния клеток. Ладастен увеличивал содержание пролиферирующих клеток — крупных клеток с повышенным боковым светорассеянием (регион R3), которые расценивались как бластные клетки [11], причем комитогенный эффект препарата был более выражен при использовании его в минимальной концентрации — 0,1 мкМ (рис. 1). Отношение содержания клеток в регионе R3 к содержанию клеток в регионе R2 (не пролиферирующие клетки) составило в культурах стимулированных aCD3 МКА (M \pm SD) 1,46 \pm 0,27, в культурах мононуклеаров, стимулированных в присутствии 0,1 и 1,0 мкМ ладастена — 1,7 \pm 0,16 ($p = 0,035$, парный критерий Стьюдента) и 1,61 \pm 0,35 соответственно.

Комитогенный эффект сопровождался увеличением экспрессии фосфорилированной формы MAP-киназы ERK2 и снижением ее нефосфорилированной формы (рис. 2).

Рис. 1 и 3 иллюстрируют экспрессию Fas рецептора CD3+ на Т-лимфоцитах. Ладастен не изменял экспрессию Fas рецептора в контрольных (нестимулированных) культурах. Активация Т-лимфоцитов aCD3 МКА приводила к резкому увеличению экспрессии CD95, что связано с зависимой от протеинкиназы С (PKC) активацией т.н. гена, ассоциированного с Т-клеточной смертью (T-cell death-associated gene 51, TDAG51) [16]. Ладастен (0,1 мкМ) незначительно усиливал активационно-индуцированную экспрессию CD95 (статистически значимых отличий от культур лимфоцитов, стимулированных aCD3 МКА без ладастена, не было), что закономерно связано с более интенсивным митогенезом.

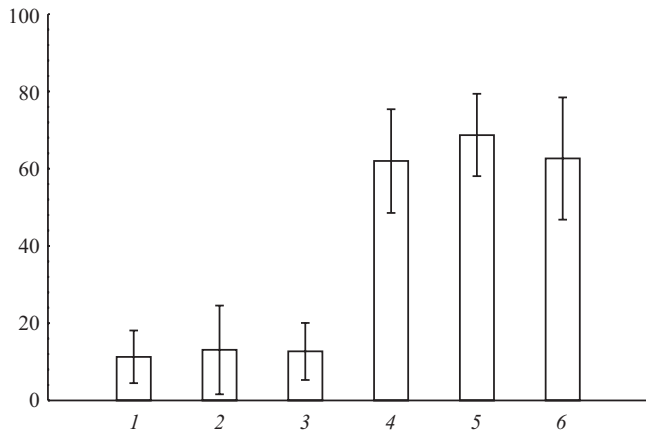


Рис. 3. Влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию Fas-рецептора на Т-лимфоцитах в 72-часовых культурах мононуклеаров периферической крови здоровых доноров.

По оси абсцисс: 1 — контрольные культуры; 2 — ладастен 0,1 мкМ; 3 — ладастен 1,0 мкМ; 4 — аCD3 МКА 2,5 мкг/мл; 5 — аCD3 МКА 2,5 мкг/мл + ладастен 0,1 мкМ; 6 — аCD3 МКА 2,5 мкг/мл + ладастен 1,0 мкМ; по оси ординат — относительное содержание CD3+CD95+ клеток, %. Результаты представлены как среднее значение (M) ± стандартное отклонение (SD).

Для оценки влияния ладастена на чувствительность активированных клеток к Fas-индуцированному апоптозу после инкубации клетки отмывали и обрабатывали в течение пяти часов полуагонистическими МКА к В-эпиту Фаs-рецептора (клон DX-2, подкласс IgG1). Из 8 доноров индукция Fas-зависимого апоптоза активированных Т-лимфоцитов (нарастание суммарной активности Cs-3,7,10 после инкубации с антиРаз МКА) наблюдалась у 5 человек (рис. 4). Это связано с тем, что Т-лимфоциты периферической крови резистентны к Fas-зависимому апоптозу и, в отличие от Т-клеточных линий, характеризуются значительной межиндивидуальной вариабельностью, отражающей особенности иммунореактивности [16]. В культурах доноров, резистентных к Fas-индуцированному апоптозу, ладастен не изменял суммарной активности Cs-3,7,10 при инкубации с аFas МКА. У тех доноров, у которых на-

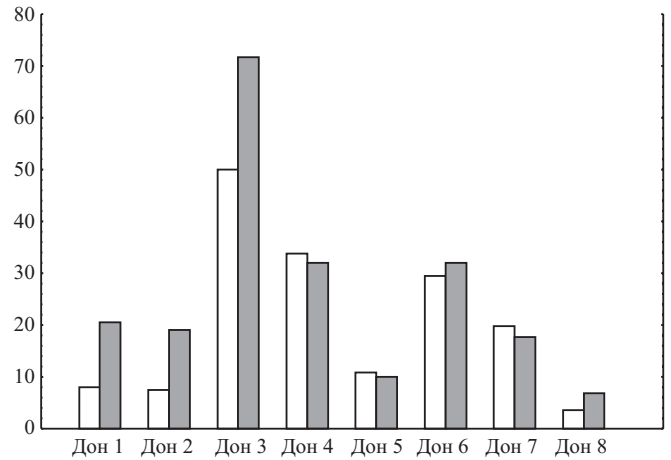


Рис. 4. Индивидуальные показатели Fas-индуцированного апоптоза стимулированных аCD3 МКА Т-лимфоцитов периферической крови (72-часовые культуры) здоровых доноров-добровольцев.

По оси абсцисс — доноры; по оси ординат — активность терминальных каспаз (Cs-3,7,10) (S/t) в лизатах лимфоцитов после 5-часовой инкубации с мышиными IgG1 (контроль, светлые столбики) или мышиными МКА (IgG1) против Fas-рецептора человека (темные).

блюдалась индукция апоптоза, ладастен статистически значимо ингибировал его (таблица).

Таким образом, ладастен проявлял комитогенный эффект, более выраженный при использовании низкой концентрации, что сопровождалось нарастанием фосфорилированной формы киназы ERK2. Как известно, активация ERK пути MAP-киназного каскада происходит при действии на клетку митогенов и ростовых факторов [19]. В зависимости от природы действующего агента и типа ткани фосфорилирование ERK 1/2 может стимулировать синтез разных циклинов, которые в комплексе с циклинзависимыми киназами в конечном счете и определяют переход клеток из одной фазы в другую. Анализируя имеющиеся в литературе сведения, а также полученные нами данные об увеличении фосфорилирования киназы ERK 2 в Т-лимфоцитах под действием ладастена, можно полагать, что его комитогенный эффект, возможно, сопряжен с активацией циклинзависимой киназы Cdk 2, образующей комплексы с циклином E-основным циклином, обеспечивающим переход клеток из G₁ фазы в S-фазу клеточного деления. Выяснение данного вопроса требует дальнейших исследований.

Апоптоз Т-лимфоцитов, реализуемый через систему Fas/FasL, является ключевым механизмом удаления “невостребованных” в процессе иммунного ответа Т-клеток и регуляции их численности [13, 16]. Дефектность этого механизма приводит к значительным нарушениям иммунного гомеостаза. Так, недостаточная интенсивность Fas-зависимой элиминации клеток вследствие генетического дефекта Fas или FasL приводит к развитию аутоиммунных расстройств [15, 16], а избыточная элиминация клеток — к развитию иммунодефицитных состояний [8, 17]. Увеличение интен-

Влияние ладастена на интенсивность Fas-индуцированного апоптоза в культурах стимулированных аCD3 МКА лимфоцитов, чувствительных к Fas-индуцированному апоптозу доноров (n = 5)

Условия культивирования		Базальная активность Cs-3,7,10, ΔS/Δt	Fas-индуцированная активность Cs-3,7,10, ΔS/Δt	Нарастание активности Cs-3,7,10 в % к базальной
аCD3 МКА, мкг/мл	Ладастен, мкМ			
2,5	—	19,7 ± 8,7	29,6 ± 11,1*	88,6
2,5	0,1	20,8 ± 7,9	25,3 ± 7,7	38,3
2,5	1,0	20,4 ± 9,3	22,1 ± 6,6	31,6

Примечание. * — различия статистически значимы (p < 0,05) в сравнении с культурами, не обработанными аFas МКА. Парный критерий Вилкоксона.

сивности Fas-зависимой, активационно-индуцированной клеточной смерти лимфоцитов наблюдается при стрессорных воздействиях [16, 20]. Это связано не только с нарушением опиоидергической регуляции иммунного ответа, но и с нарушением внутриклеточного оксидативного баланса, играющего ключевую роль в выборе клеткой программы активации [12]. Активные формы кислорода потенцируют экспрессию FasL и Fas-зависимый апоптоз [9]. Ладастен не увеличивал интенсивности активационно-индуцированной экспрессии Fas на Т-лимфоцитах, а наблюдаемое незначительное увеличение экспрессии Fas связано с комитогенным эффектом препарата. В то же время ладастен снижал чувствительность клеток к Fas-индуцированному апоптозу, т.е. в условиях избыточной экзогенной активации Fas. Этот механизм может лежать в основе иммунопротекторного эффекта ладастена и скорее всего связан с известным антиоксидантным действием препарата [4].

ВЫВОДЫ

1. Ладастен в диапазоне концентраций 0,1 – 1 мкМ проявляет комитогенный эффект при TCR-опосредованной стимуляции Т-лимфоцитов периферической крови человека, что сопровождается увеличением экспрессии фосфорилированной формы MAP-киназы ERK2.

2. Ладастен практически не изменяет активационно-индуцированную экспрессию Fas на Т-лимфоцитах, но у чувствительных к Fas-зависимому апоптозу доноров снижает интенсивность Fas-зависимого апоптоза, что может лежать в основе иммунопротекторного эффекта препарата.

Работа выполнена по программе “Физико-химическая биология” Президиума РАН, при частичной поддержке гранта РФФИ № 02-04-97904 и Программы го-

сударственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00-15-97810 и НШ 2217.2003.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Г. Арцимович, Т. А. Фадеева, Т. С. Галушкина, *Int. J. Immunorheab.*, № 6, 70 – 73 (1997).
2. Ю. В. Вахитова, С. В. Сибиряк, Н. Н. Курчатова, С. Б. Середенин, *Экспер. клин. фармакол.*, № 6, 49 – 52 (2002).
3. Т. С. Галушкина, Т. А. Фадеева, Н. Г. Арцимович, *Иммунология*, № 4, 31 – 34 (1996).
4. С. А. Сергеева, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Москва (1993).
5. С. В. Сибиряк, М. Г. Давыдович, С. А. Сергеева и др., *Тез. Докл. V Рос. нац. конгр. “Человек и лекарство”*, Москва (1998), 524.
6. С. В. Сибиряк, *Иммунология Урала*, № 1, 10 – 11 (2003).
7. N. Akhmatova., R. Yusopova, S. Khaiboullina and S. Sibiryak, *Russ. J. Immunol.*, **8**, 38 – 46 (2003).
8. A. Badley, Pilon A., A. Landay and D. Lynch, *Blood*, **96**, 2951 – 2964 (2000).
9. M. Bauer, M. Vogt, M. Los, J. Siegel et al, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8048 – 8055(1998).
10. E. Chernykh., M. Norkin., O. Leplina, et al., *Russ. J. Immunol.*, **6**, 131 – 147 (2001).
11. H. Gains, L. Andersson, and G. Biberfeld, *J. Immunol. Meth.*, **195**, 63 – 72 (1996).
12. D. Hildeman, Th. Mitchell, J. Kappler, and Ph. Marrack, *J. Clin. Invest.*, **111**, 575 – 581 (2003).
13. P. Krammer, *Nature*, **207**, 789 – 795 (2000).
14. N. R. Laemmli, *Nature*, **227**(5259), 680 – 685 (1970).
15. S. Nagata and P. Goldstein, *Science*, **267**, 1449 – 1456 (1995).
16. K. Sharma., R. Wang., L. Zhang, et al., *Pharmacol. Therap.*, **88**, 333 – 347, (2000).
17. S. Sibiryak, R. Yusupova and E. Kayumova, *Russ. J. Immunol.*, **4**, 34 – 42 (1999).
18. S. Sibiryak, V. Risberg, Yusupova R. et al., *Russ. J. Immunol.*, **6**, 281 – 290 (2001).
19. Treisman R. Curr, *Opin. Cell Biol.*, **8**, 205 – 215 (1996).
20. D. Yin, D. Tuthill, R. Mufson, and R. Shi, *J. Exp. Med.*, **169**, 1747 – 1756 (2000).

Поступила 20.11.03.

THE EFFECT OF LADASTEN ON THE ACTIVATION-INDUCED EXPRESSION OF FAS RECEPTOR ON T-LYMPHOCYTES AND THEIR SENSITIVITY TO FAS-INDUCED APOPTOSIS

Yu. V. Vakhitova^{1,2}, M. Kh. Salimgareeva², S. V. Sibiryak³, N. N. Kurchatova³, and S. B. Seredenin¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia;

² Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia;

³ All-Russia Center for Ophthalmic and Plastic Surgery, ul. Kol'tsevaya 47, Ufa, Bashkortostan, 450040 Russia

The effects of ladasten on the activation-induced expression of Fas-receptor on T-lymphocytes, their sensitivity to Fas-induced apoptosis, and the expression of mitogen-activated ERK1/ERK2 protein kinases have been studied. In the range of concentrations 0.1 – 10 μM, ladasten exhibited a comitogenic effect on the TCR-mediated stimulation of T-lymphocytes ion the peripheral human blood, which was accompanied by an increase in the level of phosphorylated form of ERK-2. At the same time, ladasten virtually did not change the activation-induced expression of Fas-receptor on T-lymphocytes, but reduced the rate of the Fas-induced apoptosis. It was concluded that the immunoprotective effect of ladasten is probably based on a decrease in the rate of Fas-induced apoptosis.