

ВЛИЯНИЕ sFASL НА УРОВНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА

МАРГАРЯН С.,^{1,2} МАРТИРТОСЯН А.,^{1,2} КАРАБОН Л.,³
ВИТКОВИЧ А.,³ МАНУКЯН Г.^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Российско-Армянский (Славянский) университет, Ереван, Армения

³Институт иммунологии и экспериментальной терапии им. Л. Хирифельда, Вроцлав, Польша

Сахарный диабет второго типа (СД2т) является метаболическим заболеванием, характеризующимся хронической гипергликемией, недостаточностью секреции или действия эндогенного инсулина, а также дисфункцией бета клеток поджелудочной железы. Результаты последних исследований показывают, что в основе развития многих осложнений при СД2т лежит нарушенная регуляция окислительного стресса. Целью данной работы явилось определение влияния растворимого лиганда Fas (solubleFasL) на окислительные процессы в клетках врожденного иммунитета у больных СД2т и здоровых доноров. В частности, определялись уровни активных форм кислорода (АФК) и экспрессии некоторых генов окислительного стресса (*NCF-1*, *Catalase*). Согласно полученным данным, sFasL значительно повышает уровни АФК в клетках цельной крови больных СД2т. Также было показано, что в нейтрофилах больных после воздействия sFasL уровни экспрессии каталазы снижаются по сравнению с контрольной группой. Кроме того, неиндуцированный и sFasL-индуцированный уровень экспрессии гена NADPH оксидазы оказался ниже в нейтрофилах больных, чем в здоровых клетках. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что sFasL способствует повышению уровней окислительного стресса у больных СД2т. Однако, пониженные уровни экспрессии NADPH оксидазы как в неиндуцированных так и sFasL-индуцированных нейтрофилах больных СД2т указывают на то, что NADPH оксидаза, вероятнее всего, не вовлечена в процесс sFasL-индуцированного повышения уровней окислительного стресса.

окислительный стресс, sFasL, NADPH оксидаза, каталаза, АФК

Сахарный диабет 2-ого типа (СД2т) является метаболическим расстройством, характеризующимся гипергликемией и недостаточностью секреции или действия эндогенного инсулина, а также дисфункцией бета клеток поджелудочной железы. Причиной развития СД2т могут являться комплекс факторов, в том числе генетическая предрасположенность и факторы окружающей среды. СД2т зачастую связан с острыми макро- и микро-васкулярными осложнениями, которые приводят к повреждению тканей внутренних органов примерно у половины людей с диабетом [1]. Механизмы, лежащие в основе развития осложнений при СД2т, полностью не изучены. Одной из основных причин развития осложнений при СД2т считается нарушение регуляции окислительного стресса, что проявляется в повышении продукции свободных радикалов, а также нарушениях в системе антиоксидантной защиты организма [2]. Известно, что заболевание связано с активацией некоторых транскрипционных факторов и протеинкиназы С, а также образованием конечных продуктов гликозирования (КПГ). В плазме крови конечные продукты гликозирования связываются с рецепторами КПГ, находящимися на поверхности макрофагов, эндотелиальных и мышечных клетках сосудов. Этот процесс приводит к образованию активных форм кислорода, что в свою очередь активирует экспрессию воспалительных генов [3].

Недавно было показано, что генерация АФК приводит к активации рецептора Fas [4]. Кроме того, у больных СД2т повышенные уровни глюкозы увеличивают уровни экспрессии рецептора Fas и его лиганда FasL [5]. Однако, влияние лиганда sFasL (soluble FasL) на уровни окислительного стресса при СД2т не было изучено. Целью данной работы явилось определение влияния sFasL на окислительные процессы в нейтрофилах у больных СД2т и здоровых контролей. Для этой цели были изучены уровни АФК в клетках цельной крови после стимуляции sFasL, а также уровни мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (CAT).

Материалы и методы

Образцы периферической крови были получены от 17 больных СД2т (средний возраст 54.5 ± 4.8) и 13 здоровых контролей (средний возраст 35 ± 5.2). Диагноз СД2т был поставлен согласно международным критериям (ВОЗ, 2003). Исследование было одобрено этическим комитетом института молекулярной биологии НАН РА (IRBIORG0003427).

Invitro модель индуцирования клеток sFasL: Образцы цельной крови были культивированы в среде RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 2 mM-глутамина. Для исследования экспрессии генов в нейтрофилах, клетки были выделены на градиенте Histopaque®-1077, после чего 6×10^6 клеток были культивированы в той же среде в течение 3 часов при 37°C . Для изучения *invitro* воздействия sFasL лиганда (150 ng/ml) клетки были культивированы в присутствии или отсутствии лиганда. После культивации образцы цельной крови были использованы для измерения уровней окислительного стресса, а нейтрофилы были сохранены при -20°C в RNeasy до проведения ПЦР в реальном времени.

Измерение уровней АФК: Уровни окислительного стресса измерялись с помощью дигидрорадамина 123 (DHR-123). После культивации клетки цельной крови были инкубированы в присутствии $10 \mu\text{M}$ DHR-123 при 37°C . После инкубации клетки были лизированы и анализированы на проточном цитометре (Partec CyFlowSpace).

Выделение РНК и проведение ПЦР в реальном времени: Для выделения РНК был использован RNeasy® MiniKit (QIAGEN) согласно протоколу производителя. Синтез к ДНК был осуществлен с помощью набор aiScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit (BIORAD). ПЦР в реальном времени был проведен с помощью техники TaqMan® Gene Expression Assays. ПЦР в реальном времени был запущен на приборе Applied Biosystem Viia 7 Real-Time. В качестве внутреннего контроля был использован $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$).

Статистический анализ: Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, USA). Нормальное распределение было проверено с помощью теста нормальности D'Agostino и Pearson. Группы сравнивались между собой при помощи *Paired* и *Unpaired t* теста. Статистически достоверным принималось различие между группами при значении $P \leq 0.05$.

Результаты

Согласно полученным данным спонтанная экспрессия изучаемых генов и продукция АФК в образцах цельной крови не была изменена в обеих исследуемых группах (Рисунок 2). Уровни окислительного стресса после воздействия sFasL в здоровых и больных клетках были повышены, однако только в клетках больных СД2т разница оказалась статистически достоверной ($p=0.05$) (Рисунок 1). В нейтрофилах больных СД2т после воздействия sFasL уровни экспрессии каталазы снижались по сравнению с контрольной группой ($p<0.05$). Уровни экспрессии гена NADPH оксидазы в неиндуцированных ($p<0.05$) и sFasL-индуцированных ($p<0.01$) нейтро-

филах больных СД2т были понижены по сравнению с таковыми показателями здоровых клеток (Рисунок 2).

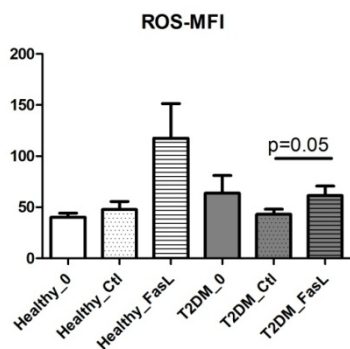


Рисунок 1: Уровень АФК в клетках оценивался по значению средней интенсивности флуоресценции родамина (MFI). Представлены базальные (0), неиндуцированные (Ctl) и sFasL-индуцированные (FasL) уровни АФК в клетках цельной крови здоровых доноров и больных СД2т.

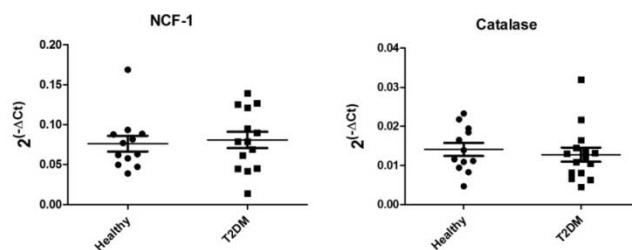


Рисунок 2: Уровни спонтанной экспрессии мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (Catalase) в нейтрофилах больных СД2т (T2DM) и здоровых доноров (Healthy). Уровни экспрессии исследуемых генов по отношению к эндогенному контролю ($\beta 2M$) представлены в значении $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

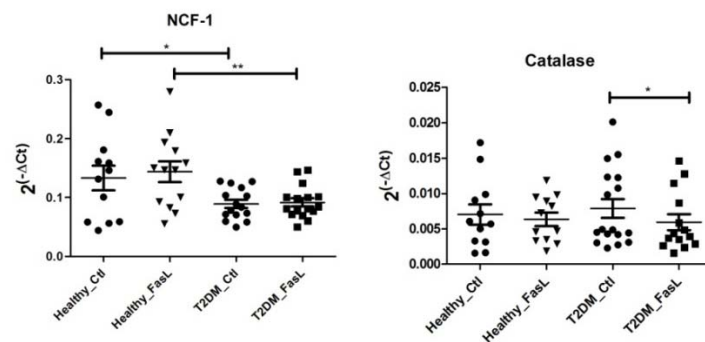


Рисунок 3: Уровни мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (Catalase) в неиндуцированных (Ctl) и sFasL-индуцированных (FasL) нейтрофилах больных СД2т (T2DM) и здоровых доноров (Healthy). * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ достоверность отличий между группами.

Обсуждение

Окислительный стресс играет ключевую роль в повреждении клеток организма при СД2т. Высокие уровни глюкозы приводят к образованию свободных радикалов в эндотелиальных клетках, нейтрофилах и макрофагах, что в конечном счете приводит к повышению уровней окислительного стресса в организме [6]. Полученные нами данные впервые показывают, что sFasL повышает уровни АФК в клетках цельной крови больных СД2т. Подтверждением этого явились сниженные уровни экспрессии

каталазы после воздействия sFasL. Каталаза является одним из основных ферментов антиоксидантной защиты организма, которая инактивирует образовавшиеся продукты окислительного стресса [7]. Недавно было показано, что недостаток каталазы вызывает увеличение продукции АФК в бета клетках поджелудочной железы, что в конечном итоге приводит к разрушению этих клеток [8].

В нейтрофилах NADPH оксидаза играет основную роль в процессе образования АФК [9]. Однако, несмотря на то, что уровни экспрессии оксидазы у больных были существенно ниже, чем у здоровых доноров (как в неиндуцированных, так и sFasL-индуцированных клетках), уровни экспрессии NADPH оксидазы (NCF-1) в нейтрофилах больных после воздействия sFasL остались неизменными.

Полученные результаты указывают на то, что усиление sFasL-индуцированных окислительных процессов в нейтрофилах больных СД2т возникает NADPH-независимым путем. Необходимы дальнейшие исследования с целью выявления альтернативных сигнальных путей, вовлеченных в процессы усиленного окислительного стресса при СД2т.

Благодарность. Работа была выполнена при поддержке Российско-Армянского университета в рамках гранта Министерства образования и науки РФ, и Государственного комитета по науке МОН РА в рамках проекта №16А-1f44.

Литература

1. *Cade WT.* Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *PhysTher*2008;88:1322-35.
2. *Ceriello A.* Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49(2, Suppl 1):27–29.
3. *Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.
4. *Medan D, Wang L, Toledo D, Lu B, Stehlik C, Jiang BH, Shi X, Rojanasakul Y.* Regulation of Fas (CD95)-induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. *J Cell Physiol* 2005;203(1):78-84.
5. *Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A et al.* Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1683–1690.
6. *Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M.* Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Dec;11(12):3071-109.
7. *Shu YZ.* Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod*. 1998 Aug;61(8):1053-71.
8. *L. Góth and J. W. Eaton.* Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet*. 2000 Nov 25;356(9244):1820-1.
9. *Bedard K and Krause KH.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.