

ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.438-018.1-02:615.331:579.222:547.915]-078.33

И. В. Титова, В. Г. Сергеев, А. А. Ярилин, И. Г. Акмаев

ЭКСПРЕССИЯ ДВУХ ИЗОФОРМ НИТРОКСИДСИНТАЗЫ В ТИМУСЕ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА

Институт экспериментальной эндокринологии Эндокринологического научного центра РАМН, Институт иммунологии Минздрава РФ, Москва

В криостатных срезах тимуса крыс иммуногистохимически с использованием специфических антител определяли локализацию двух изоформ нитрооксидсинтазы — индуцибельной (iNOS) и нейрональной (nNOS). Установлено, что в тимусе интактных мышей iNOS локализуется в клетках кортико-медуллярной зоны, а nNOS — в более многочисленных отростчатых клетках медуллярной и кортико-медуллярной зон. Одновременной экспрессии двух изоформ NOS в одних и тех же клетках не наблюдалось. Под влиянием введения крысам бактериального липополисахарида число клеток, экспрессирующих iNOS, увеличилось в 1,5 раза, а число клеток, содержащих nNOS, не изменялось.

Frozen sections of rat thymus were examined by fluorescence immunoassay with specific antibodies to the inducible and neuronal isoforms of nitroxydsynthase - iNOS and nNOS. As for the intact animals, iNOS was detected in them in a limited quantity of cells of the cortico-medullary zone, whereas nNOS was found in an essentially bigger number of cells of the cortico-medullary and medullary zones. nNOS cells were of the dendritic configuration. After the rats were administered the bacterial lipopolysaccharide, the quantity of iNOS cells was increasing and their fluorescence intensity was intensifying. Simultaneously, the number of the nNOS cells did not change, while their fluorescence intensity was weakening.

Известны три изоформы нитрооксидсинтазы (NOS) — фермента, катализирующего образование оксида азота в процессе превращения L-аргинина в цитруллин: макрофагальная, эндотелиальная (eNOS) и нейрональная (nNOS). Две последние изоформы являются конститутивными, тогда как первая представляет собой индуцибельный фермент (iNOS). Ее экспрессия усиливается бактериальными продуктами, включая эндотоксин, а также провоспалительными цитокинами [7, 10].

Ранее было установлено, что iNOS экспрессируется в макрофагах и дендритных клетках тимуса [3], а при некоторых условиях обработки цитокинами — также в эпителиальных клетках тимуса [12]. Продукты ее активности принимают участие в индукции апоптоза тимоцитов в коре и кортико-медуллярной зоне [12, 13].

Об экспрессии в тимусе других изоформ NOS известно мало. Сообщалось о конститутивной экспрессии eNOS в эндотелии радиально ориентированных сосудов коры [1], а также в 15% тимоцитов крыс [5]. nNOS определяется в периваскулярных нервных сплетениях тимуса [1]. Клетки, содержащие NOS в септах тимуса, сококализируются с нейрональными маркерами, в частности с нейропептидом — субстанцией P [9]. Имеются косвенные свидетельства наличия конститутивных NOS также в "эпителиальном пространстве" тимуса. Так, локализация клеток тимуса, в которых NOS выявляется неспецифическим методом (с помощью реакции на NADPH-диафорузу) и с помощью специфических антител к iNOS, не вполне совпадает [6]. Учитывая, что в тимусе содержатся клетки нейронального происхождения [11], можно ожидать, что они экспрессируют nNOS.

Данная работа посвящена сравнительному изучению спонтанной и индуцированной введением бактериального эндотоксина экспрессии iNOS и nNOS в клетках тимуса крыс.

Материал и методы. В работе использованы крысы-самцы линии Sprague-Dawley массой 270—300 г, содержащиеся в условиях стандартного режима. В опытной группе крысам вводили внутривенно 1 мл раствора липополисахарида (ЛПС) *Salmonellae abortus equi* ("Sigma") в дозе 125 мкг на 1 кг массы тела на 0,9% растворе NaCl. Контрольным мышам вводили 1 мл физиологического раствора. Через 4 ч крыс анестезировали пентобарбиталом натрия и внутрисердечно перфузировали фиксатором (50 мл 4% раствора параформальдегида и 0,4% пикриновой кислоты на 0,16 М фосфатном буфере pH 6,9). Извлекали тимус, отмывали его 0,16 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 10% сахарозы, в течение 24 ч и замораживали на сухом льду.

Криостатные срезы толщиной 14 мкм на стеклах, обработанные желатиной и хромовыми квасцами, инкубировали в течение ночи при 4°C с мышиными моноклональными антителами к nNOS ("Peninsula") в разведении 1:1000. Связывание антител регистрировали с помощью набора "DuPont" ("New England Nuclear"). Для этого срезы промывали в течение 10 мин в 0,1 М трис-буфере pH 7,5 на физиологическом растворе с 0,05% твин-ом 20, инкубировали в течение 30 мин в том же растворе при комнатной температуре с добавлением блокирующего реагента ("DuPont Blocking Reagent"). Затем срезы инкубировали со свинными антителами к мышиному IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Dako A/S"), разведенными трис-буфером (1:100), и дважды промывали в трис-буфере по 10 мин. После этого с целью усиления сигнала срезы инкубировали в растворе биотинированного тирамида (1:50). После 3-кратного промывания в трис-буфере препараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в растворе авидина, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) ("Amersham") в разведении 1:200. Затем срезы инкубировали с антителами морской свинки к iNOS ("Peninsula"), разведенными 1:100 изотоническим фосфатным буфером, 12 мин при 4°C. После промывки в изотоническом фосфатном буфере срезы обрабатывали кроличьими антителами к IgG морской свинки, меченными родамином (1:100) в течение 30 мин при 37°C. Срезы отмывали тем же буфером и покрывали смесью глицерола и буфера, содержащей 0,1% парафенилендиамина ("Sigma").

Срезы исследовали в флуоресцентном микроскопе "Nikon" с использованием пропускающего ($\lambda = 480$ нм для ФИТЦ и $\lambda = 546$ нм для родамина) и запирающего ($\lambda = 520$ нм для ФИТЦ и $\lambda = 590$ нм для родамина) фильтров.

Подсчет клеток и измерение интенсивности люминесцентного свечения производили посредством компьютерного анализа видеоизображения с применением программы "Image Pro" ("Medical Kibernetics"). Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Присутствие pNOS выявлено в отростчатых клетках, локализуемых в кортико-медуллярной зоне и мозговом веществе тимуса крыс вне периваскулярных зон. Клетки, экспрессирующие iNOS, содержатся в меньшем количестве в кортико-медуллярной зоне. Использование двухцветного иммуногистохимического мечения показало, что две изоформы NOS экспрессируются в разных клетках: двойное окрашивание клеток не обнаружено.

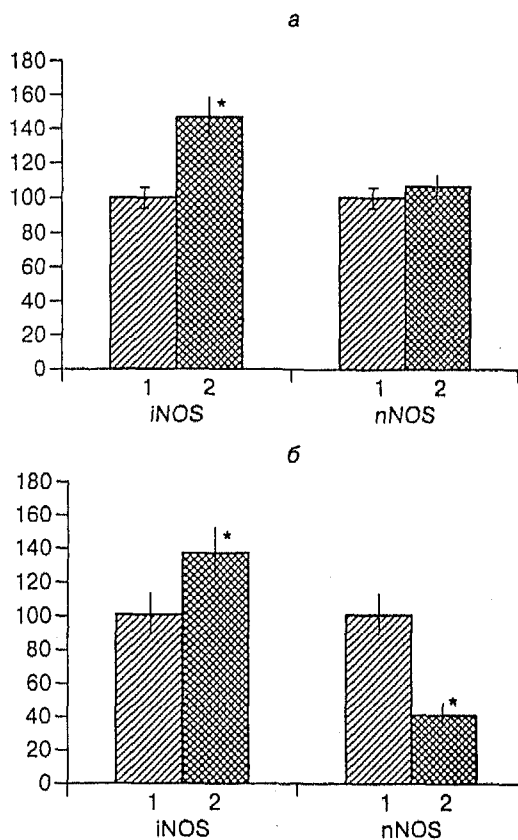
Введение ЛПС приводило к 1,5-кратному увеличению числа iNOS⁺-клеток, но практически не влияло на число pNOS⁺-клеток. Одновременно происходило существенное усиление интенсивности флюоресценции клеток при их окрашивании на iNOS и, наоборот, ослабление флюоресценции при выявлении pNOS (см. рисунок).

Данные, касающиеся экспрессии iNOS и ее изменений под влиянием бактериального ЛПС, вполне соответствуют данным литературы о локализации и условиях экспрессии этой изоформы NOS в тимусе. Не вызывает сомнений, что экспрессия iNOS в макрофагах и дендритных клетках усиливается под влиянием бактериальных продуктов и провоспалительных цитокинов. Поскольку причастность продуктов реакций, катализируемых этим ферментом (в особенности пероксинитрита),

к индукции апоптоза тимоцитов не вызывает сомнений [12, 13], естественно видеть в усилении активности iNOS в указанных условиях предпосылку развития опустошения тимуса, наблюдаемого при бактериальных инфекциях, введения суперантигенов и ЛПС. Более того, показано, что экспрессия iNOS в дендритных клетках усиливается в условиях процессинга и презентации антигена [3]), а также при активации тимоцитов антителами к CD3 [13], воспроизводящими сигнализацию через T-клеточный рецептор, что ставит активацию данной изоформы NOS в прямую связь с процессом селекции (особенно отрицательной) тимоцитов.

Значительно меньше точек опоры при обсуждении данных о локализации в тимусе pNOS. Прежде всего обращает внимание большая многочисленность pNOS⁺-клеток по сравнению с iNOS⁺-клетками при сходстве их локализации и противоположном характере реакции на ЛПС. Редкие работы, посвященные данной изоформе NOS, сосредоточены на ее выявлении в нервных клетках. Действительно NOS выявлена (неспецифическим методом, по реакции на NADPH-диафору) в нервных волокнах, сплетениях, а также в септальных нервных клетках [1, 9]. Естественно, что данный подход не позволил авторам идентифицировать pNOS в клетках кортикомедуллярной и медуллярной зон, богатых iNOS. В то же время, как упоминалось во вступлении, при сочетании неспецифического подхода к определению NOS с иммуноспецифическим выявлением iNOS в тимусе показано, что ферменты, выявляемые с помощью этих двух подходов, не полностью сококализируются между собой [6]. Естественно предположить, что активность NOS, не сококализирующаяся с iNOS, соответствует другой изоформе фермента, что и подтверждают результаты данного исследования.

На основании использованного нами иммуногистохимического подхода к выявлению pNOS⁺-клеток (более детально он представлен в публикации [2]) нельзя сделать сколько-нибудь определенного вывода об их природе. Отростчатая форма этих клеток не противоречит их возможному отношению как к дендритным, так и к эпителиальным. Именно последняя возможность представляется наиболее вероятной. Дело в том, что значительная часть эпителиальных клеток тимуса, вероятно, происходящих из нервного гребня, имеет черты общности с некоторыми нервными клетками (в частности, с астроцитами [11]), а также с нейроэндокринными клетками, экспрессирующими маркер клеток нейрального происхождения ганглиозид GQ, выявляемый моноклональными антителами A2B5 [4]. С последними их объединяет способность секретировать многочисленные нейропептиды [8]. Уже установлена сококализация NADPH-диафоразы с одним из нейропептидов — субстанцией P — в нервных волокнах тимуса [9]. Для окончательного вывода об экспрессии pNOS в эпителиальных клетках потребуются эксперименты по выявлению коэкспрессии pNOS в эпителиальных (а не только в нервных) клетках тимуса с мембранными или цитоплазматическими маркерами этих клеток.



Число клеток на срезах тимуса, в которых иммунофлюоресцентным методом выявляют индуцибельную (iNOS) и нейрональную (pNOS) изоформы NOS.

1 — контроль; 2 — ЛПС.

По оси ординат: число иммунореактивных клеток (а) и интенсивность свечения (б), выраженные в процентах к контролю ($M \pm m$). * — $p < 0,05$ (относительно контроля).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорко А., Ключова Д., Дорко Е. и др. Сравнительное изучение топографической локализации NADPH диафлораза-позитивных клеток в тимусе кроликов и фазанов // Укр. биохим. журн. — 2002. — Т. 74. — С. 111–116.
2. Титова И. В., Сергеев В. Г., Ярилин А. А., Акмаев И. Г. Экспрессия нейрональной и индуцибельной изоформ нитрооксидсинтазы в тимусе в норме и при введении бактериального эндотоксина // Бюл. exper. биол. — 2002. — Т. 134. — С. 470–473.
3. Aiello S., Noris M., Piccinini G. et al. Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self and alloantigens // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 4649–4658.
4. Botham C. A., Jones G. V., Kendall M. D. Immunological characterization of neuroendocrine cells of the rat thymus gland in vitro and in vivo // Cell Tissue Res. — 2001. — Vol. 263. — P. 381–389.
5. Cruz M. T., Carmo A., Carvalho A. P., Lopes M. J. Calcium-dependent nitric oxide synthase activity in rat thymus // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — Vol. 247. — P. 98–103.
6. Downing J. E., Virag L., Jones I. W. NADPH diaphorase-positive dendritic profiles in rat thymus discrete from autofluorescent cells, immunoreactive for iNOS, and show antigen-specific abundance differences // Immunology. — 1999. — Vol. 95. — P. 148–155.
7. Forsternann U., Closs E. I., Pollock J. S. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions // Hypertension. — 1994. — Vol. 23. — P. 1121–1131.
8. Geenen V., Kecha O., Martens H. Thymic expression of neuroendocrine self-peptide precursors: role in T-cell survival and self-tolerance // J. Neuroendocrinol. — 1998. — Vol. 11. — P. 811–822.
9. Gulati P., Tay S. S., Leong S. K. Nitroergic, peptidergic and substance P innervation of the chicken thymus // J. Hirnforsch. — 1997. — Bd 38. — S. 553–564.
10. Knepper R. G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals // Biochem. J. — 1994. — Vol. 298. — P. 249–258.
11. Marzocchi A., Kendall M. D. The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments // Immunol. Today. — 2000. — Vol. 21. — P. 133–140.
12. Munn S. H., Truffault F., Gaudry-Talarnain Y. M. et al. In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitric oxide formation // Blood. — 2001. — Vol. 97. — P. 200–210.
13. Tanaka K., Miyake K., Yamamoto N. et al. Expression of an inducible form of NO synthase in the thymus and involvement of nitric oxide in TCR-stimulated double-positive thymocytes // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158. — P. 4696–4703.

Поступила 19.12.02

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.211-002-056.43-085.3571-076.33

О. П. Уханова, С. З. Чуков, Т. В. Писемников, Л. П. Бондарева

ДИНАМИКА АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТОПИЧЕСКИХ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ

Ставропольская государственная медицинская академия, Ростовский государственный медицинский университет

При обострении сезонного АР в слизистой оболочке носа имеет место усиление апоптоза лимфоцитов, что свидетельствует о срыве локальных защитных механизмов и недостаточности процесса лечения АР топическим глюкокортикостероидом флутиказоном пропионатом. Снижение апоптоза лимфоцитов на фоне лечения флутиказоном пропионатом и Fas-рецепторов на поверхности лимфоцитов назального секрета, пропорциональное тяжести течения заболевания, что указывает на восстановление клеток, чувствительных к действию проапоптотических факторов, из полости носа под влиянием лечения. Интенсификация абсолютного и относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих фосфатидилсерин и протеин Fas/FasL, свидетельствует о восстановлении структуры слизистой оболочки носа в процессе терапии топическим кортикостероидом.

There is an intensified apoptosis of lymphocytes in the nasal mucosa during the season-related exacerbation of allergic rhinitis (AR), which is indicative of a breakdown of protective mechanisms and insufficiency of the Bcl-2 system anti-apoptosis function. An attenuated expression of phosphatidyl serine and of Fas/FasL on the lymphocyte membranes (which is proportional to a disease severity) is revealed on the treatment of AR by the topical corticosteroid of fluticasone propionate; it denotes a possibility of elimination of cells, sensitive to the action of proapoptosis factors, from within the nasal cavity owing to therapy. The normalized absolute and relative content of lymphocytes, which express phosphatidyl serine and protein Bcl-2, as well as the normalized quantity of Fas/FasL on the lymphocytes, which express the Fas/FasL molecules, testify to the recovery of the nasal mucosa during the therapy by the topical corticosteroid.

Аллергический ринит (АР) относится к наиболее распространенным аллергическим заболеваниям дыхательных путей. АР развивается по типу реакции гиперчувствительности I типа. Характерной чертой аллергического ринита является инфильтрация тканей слизистой оболочки носа базофилами и эозинофилами [3].

В последнее время установлено, что патогенез атрофических заболеваний лежит не только в нарушении функциональной активности, но и в нарушении различных видов клеточной гибели [4].

Апоптоз — это запрограммированная клеточная гибель. Однако сведения о проявлениях и патогенезе роли программированной клеточной гибели лимфоцитов при АР в органах-мишенях весьма ограничена; столь же ограничена информация о влиянии топических глюкокортикостероидов, широко применяемых в лечении АР, на процессы апоптоза лимфоцитов.

Целью настоящего исследования явилось определение динамики содержания лимфоцитов с признаками апоптоза в начальном секрете у пациентов с