

Взаимосвязь между показателями кислородзависимого метаболизма, апоптоза нейтрофилов и концентрацией половых гормонов у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией

Ильин М.В., к.м.н., доцент, Капельянц Е.Ю., Мальцева П.А., Романов В.А. д.м.н., профессор, Хрусталеv О.А., д.м.н., профессор, Ярославская государственная медицинская академия, кафедра терапии факультета последипломного образования, кафедра микробиологии с вирусологией и иммунологией, г. Ярославль

The relation between indices of redox regulation, apoptosis of neutrophils and sex hormones concentration in patients with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis

Ilyin M.V., Kaprelyants E.Yu., Maltseva P.A., Romanov V.A., Khrustalev O.A.

Резюме

Целью настоящего исследования стало определение взаимосвязи между концентрацией половых гормонов эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови, уровнем апоптоза и интенсивностью кислородзависимого метаболизма нейтрофилов. В исследование включены 50 больных, страдающих системной красной волчанкой (СКВ) и 28 больных системной склеродермией (ССД). Функциональное состояние нейтрофилов исследовали хемилюминесцентным методом. Для определения экспрессии проапоптотического гомолога семейства Bcl-2 на поверхности мембран нейтрофилов использовали иммуноцитохимический стрептавидин-биотиновый метод. Количественное определение содержания эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови проводили с применением метода твердофазного иммуноферментного анализа. Обнаружено снижение уровня апоптоза нейтрофилов при СКВ и ССД в сравнении с группой контроля. У больных СКВ и ССД, по сравнению с группой контроля, регистрировалось более низкое содержание эстрадиола в сыворотке крови. Обнаружено наличие обратной взаимосвязи между уровнем эстрадиола и интенсивностью продукции супероксид-аниона нейтрофилами в группе больных системной красной волчанкой ($r=-0,51$; $p=0,006$). Наблюдается прямая зависимость между резервным потенциалом нейтрофилов и уровнем тестостерона при системной склеродермии ($r=0,47$; $p=0,011$).
Ключевые слова: нейтрофил, кислородзависимый метаболизм, апоптоз, половые гормоны

Resume

The aim of the study was to investigate the relation between concentration of estradiol and testosterone in serum and level of redox regulation and apoptosis of neutrophils in 50 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 28 patients with systemic sclerosis (SS). The functional activity of peripheral blood neutrophils was analyzed by chemiluminescent method. We used streptavidin-biotin method to determine the expression of proapoptotic molecule bak by neutrophils. Immunoenzyme analysis was used to determine the concentration of estradiol and testosterone in serum. We discovered the decrease of the rate of neutrophil apoptosis in both groups of patients versus control. A decreased estradiol level was registered in patients with SLE and SS. We found negative correlation between estradiol level and superoxide generation by neutrophils in SLE patients ($r=-0.51$; $p=0.006$). A positive correlation between neutrophil reserve potential and testosterone level was observed in patients with SS ($r=0.47$; $p=0.011$).

Key words: neutrophil, redox regulation, apoptosis, sex hormones

Введение

Нейтрофильные гранулоциты, функциональная активность которых представляет собой одно из основных звеньев, связывающих неспецифические защитные реакции и иммунный ответ, играют важную роль в обеспечении иммунологического гомеостаза.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об усилении кислородзависимого метаболизма и апоптоза нейтрофилов у больных системной красной волчанкой (СКВ), сопровождающегося нарушением распознавания и удаления апоптозирующих клеток [1,2]. Однако, имеются также данные об ингибировании апоптоза нейтрофилов на фоне повреждения механизмов экспрессии белков семейства Bcl-2, способствующего увеличению количества циркулирующих клеток [3].

В экспериментах на лабораторных животных показано, что персистенция фиброза при системной склеродермии (ССД) не зависит от текущего нейтро-

Ответственный за ведение переписки -
Ильин Михаил Витальевич
150003, Ярославль, ул. Яковлевская, 7
michael_ilyin@list.ru

фильного воспаления [4]. Обнаружено существенное повышение спонтанной и стимулированной продукции кислой фосфатазы и катионных белков, а также увеличен коэффициент стимуляции нейтрофилов в циркулирующих фагоцитах у больных ССД [5]. В то же время некоторыми исследователями было выявлено неспецифическое снижение активности окислительного стресса в нейтрофилах при ССД [6].

Метаболическая активность и апоптоз нейтрофилов эффективно регулируются половыми гормонами [7, 8]. Показано, что эстрадиол обладает антиоксидантными свойствами, окисляясь в присутствии перекиси водорода, продуцируемой нейтрофилами в результате окислительного стресса [9], а тестостерон способствует снижению уровня апоптоза нейтрофилов [10]. В то же время механизмы влияния половых гормонов на кислородзависимый метаболизм и апоптоз нейтрофилов до конца не изучены.

Целью настоящего исследования стало изучение взаимосвязи между концентрацией половых гормонов в сыворотке крови, уровнем апоптоза и интенсивностью кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.

Материалы и методы

Обследованы 50 женщин, больных системной красной волчанкой, в возрасте от 18 до 73 лет (в среднем $39,9 \pm 11,3$ года), и 28 женщин в возрасте от 18 до 72 лет (в среднем $45,5 \pm 16,2$ лет), страдающих системной склеродермией. Диагноз СКВ устанавливали на основании клинических проявлений заболевания, данных лабораторных и инструментальных методов исследования и классификационных критериев Американской ассоциации ревматологов. Определяли индексы активности SLAM и SLEDAI. Для верификации диагноза системной склеродермии использовали критерии Американской ревматологической ассоциации. Контрольную группу составили 11 относительно здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с группами наблюдения.

Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фиколлаурографина. Функциональное состояние нейтрофилов исследовали хемилюминесцентным методом. Для усиления хемилюминесценции использовали люминол, потенцирующий хемилюминесценцию перекиси водорода, супероксид-аниона, гидроксил-аниона, аннона гипохлорной кислоты и нитроксил-радикала, и люцигенин, который является селективным индикатором супероксидного анион-радикала. Функциональный резерв клеток оценивали по коэффициентам активации хемилюминесценции (КА ХЛлл и КА ХЛлн), которые рассчитывали как отношение активированного показателя (аХЛлл и аХЛлн) к спонтанному (сХЛлл и сХЛлн). В качестве индуктора кислородзависимого метаболизма нейтрофилов использовали взвесь убитых нагреванием клеток *S. aureus* штамма p-209.

Для определения экспрессии проапоптозного гомолога семейства Bcl-2 bak на поверхности мембран нейтрофилов использовали иммуноцитохимический стрептавидин-биотиновый метод (реагенты «DAKOCytomation», Дания). Исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом, определяя экспрессию антигена bak на поверхности мембран клеток (bak-положительные нейтрофилы). В качестве положительного контроля использовали моноклональные мышиные антитела к гранулоцит-ассоциированному антигену CD15, отрицательный контроль – разводящая жидкость для антител.

Количественное определение содержания эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови проводили с применением метода твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя реактивов (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) на 6-7 день менструального цикла.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Осуществлялась проверка нормальности распределения количественных признаков. Для количественных признаков, имеющих распределение отличное от нормального, производилось вычисление медиан и интерквартильных интервалов (Me (25%; 75%)). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку применяли критерий Манна-Уитни. Для изучения взаимосвязи двух признаков использовался корреляционный анализ по Спирмену. Критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 5%.

Результаты

Исследование показателей кислородзависимого метаболизма, апоптоза нейтрофилов и концентрации половых гормонов в сыворотке крови больных СКВ и ССД продемонстрировало следующие различия (таблица 1).

Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют о снижении уровня апоптоза нейтрофилов при системной красной волчанке. Нейтрофилы, экспрессирующие маркер апоптоза bak на поверхности клеточных мембран, реже встречались в образцах крови больных СКВ, по сравнению с показателями контрольной группы ($13,4 (11,4; 16,3) < 18,0 (17,4; 18,8)$; $p < 0,05$). Снижение показателей апоптоза сопровождалось увеличением общей биоцидной активности нейтрофилов, по данным сХЛлл ($2,35 (1,0; 6,5) > 1,1 (0,5; 1,8)$; $p > 0,05$), и статистически значимым ростом продукции супероксид-аниона, по результатам сХЛлн ($1,2 (0,5; 2,0) > 0,55 (0,2; 1,1)$; $p < 0,05$).

Оценивая результаты сравнительного анализа показателей метаболической активности, апоптоза нейтрофилов у больных ССД и в группе контроля, следует отметить статистически значимое уменьшение количества клеток, экспрессирующих факторы апоптоза ($12,4 (9,4; 18,8) < 18,0 (17,4; 18,8)$; $p < 0,05$). По сравнению с больными СКВ, в группе больных, страдаю-

Таблица 1. Характеристика показателей кислородзависимого метаболизма, апоптоза нейтрофилов и концентрации половых гормонов у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией

Показатель	Контроль (n=11)	СКВ (n=50)	ССД (n=28)	p
сХЛл, 10 ⁴ , имп/мин	1,1 (0,5; 1,8)	2,35 (1,0; 6,5)	1,4 (0,5; 5,2)	0,18
аХЛл, 10 ⁴ , имп/мин	1,1 (0,2; 3,0)	1,0 (0,8; 4,1)	3,2 (0,6; 9,0)	0,52
сХЛлн, 10 ⁴ , имп/мин	0,55 (0,2; 1,1)	1,2 (0,5; 2,0) *	1,0 (0,3; 2,2)	0,56
аХЛлн, 10 ⁴ , имп/мин	0,3 (0,1; 0,9)	0,9 (0,1; 1,0)	0,4 (0,1; 1,1)	0,94
КА ХЛл, Ед	1,69 (0,92; 3,3)	1,0 (0,2; 1,5)	2,0 (0,38; 7,3)	0,07
КА ХЛлн, Ед	0,75 (0,25; 1,5)	0,5 (0,25; 0,9)	0,33 (0,1; 1,1)	0,73
бак-положит. нейтр., %	18,0 (17,4; 18,8)	13,4 (11,4; 16,3) *	12,4 (9,4; 18,8) *	0,84
Эстрадиол, пмоль/л	115,0 (30,0; 200,0)	57,6 (9,4; 134,0)	29,0 (5,1; 111,0)	0,043
Тестостерон, нг/мл	0,36 (0,1; 0,65)	0,23 (0,11; 0,45)	0,3 (0,15; 0,6)	0,62

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

ших ССД, наблюдалась тенденция к увеличению резерва продукции нейтрофилами гидроксил-аниона, перекиси водорода, аниона гипохлорной кислоты и нитроксильного радикала, по данным КА ХЛл (2,0 (0,38; 7,3) > 1,0 (0,2; 1,5); $p=0,07$).

У больных СКВ и ССД, по сравнению с группой контроля, регистрировалось более низкое содержание эстрадиола в сыворотке крови, выходящее за пределы референсных значений, и тестостерона, показатели которого находились в пределах нормы. При этом концентрация эстрадиола при ССД была ниже, чем при СКВ (29,0 (5,1; 111,0) < 57,6 (9,4; 134,0); $p=0,043$).

Корреляционный анализ выявил наличие обратной взаимосвязи между уровнем эстрадиола и интенсивностью продукции супероксид-аниона нейтрофилами, по данным сХЛлн ($r=-0,51$; $p=0,006$), в группе больных СКВ. Наблюдалась прямая зависимость между резервным потенциалом нейтрофилов (аХЛл) и уровнем тестостерона при ССД ($r=0,47$; $p=0,011$).

Обсуждение

Известно, что женские половые гормоны в физиологических концентрациях способствуют задержке апоптоза нейтрофилов и увеличению внутриклеточной продукции активных форм кислорода [11]. При этом повышение содержания эстрадиола сопровождается значительным снижением числа жизнеспособных нейтрофилов [12]. Снижение количества клеток, склонных к запрограммированной гибели, происходящее на фоне уменьшения концентрации эстрадиола в сыворотке крови больных СКВ и ССД, вероятно, связано с интенсивностью образования гранулоцитарно-макрофагального колоннестимулирующего фактора, играющего ключевую роль в регуляции функци-

ональной активности и жизнеспособности нейтрофилов [13].

Гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор увеличивает респираторный взрыв в нейтрофилах, усиливает генерацию супероксидного анион-радикала и антителозависимую клеточную цитотоксичность [14], а также задерживает апоптоз нейтрофилов путем ингибирования синтеза проапоптозных белков семейства Bcl-2 [15]. Снижение его концентрации на фоне уменьшения содержания эстрогенов способствует увеличению хемотаксической подвижности нейтрофилов и приводит к их накоплению в очаге воспаления [16], стимулирует синтез интерлейкина-6 и интерлейкина-8 и увеличивает продукцию ФНО- α , который значительно усиливает системные воспалительные проявления [17].

Локальные эффекты половых гормонов при аутоиммунных заболеваниях заключаются, преимущественно, в модуляции пролиферации клеток и продукции цитокинов, которые, в свою очередь, оказывают влияние на конверсию андрогенов в эстрогены, вызывая нарушение периферического синтеза эстрогенов при системной красной волчанке [18]. Дефицит эстрогенов при системной склеродермии сопровождается снижением миграции и пролиферации фибробластов, а также увеличением образования тканевого фактора роста- $\beta 1$ [19]. Взаимосвязь концентрации эстрадиола и интенсивности образования супероксид-анион объясняется, по-видимому, влиянием эстрогенов на активность p47phox НАДФ-оксидазы нейтрофилов, продуцирующей супероксидный анион-радикал [20]. Тестостерон, в свою очередь, ингибирует экспрессию факторов окислительного стресса [21], способствуя увеличению резервного потенциала нейтрофилов при ССД.

Таким образом, взаимосвязь между показателями кислородзависимого метаболизма, апоптоза нейтрофилов и концентрацией половых гормонов выражается в повышении продукции супероксид-аниона нейтрофилами при снижении концентрации эстради-

ола у больных СКВ и увеличении резервного потенциала клеток под влиянием тестостерона при ССД. Уменьшение уровня эстрадиола в сыворотке крови, более выраженное при ССД, сопровождается снижением экспрессии факторов апоптоза нейтрофилов. ■

Литература:

1. Armstrong D., Crockard A., Wisdom B. et al. Accelerated apoptosis in SLE neutrophils cultured with anti-dsDNA antibody isolated from SLE patient serum: a pilot study. *Rheumatol Int* 2006; 27(2): 153-6.
2. Donnelly S., Roake W., Brown S. et al. Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; 54(5): 1543-6.
3. Mehrad B., Park S., Akangire G. et al. The lupus-susceptibility locus, Sle3, mediates enhanced resistance to bacterial infections. *J Immunol* 2006; 176: 3233-9.
4. Hoyles R., Khan K., Shiwen X. et al. Fibroblast-specific perturbation of TGF beta signaling provides insight into potential pathogenic mechanisms of scleroderma-associated lung fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(4): 1175-88.
5. Романова Н.В., Шилкина Н.П., Ильиной Н.Ю. Интерлейкины 1 бета, 4, 6 и фактор некроза опухоли альфа у больных ограниченной и системной формами склеродермии. *Иммунология* 2006; 2: 101-4.
6. Foerster J., Storch A., Fleischanderl S. et al. Neutrophil respiratory burst is decreased in scleroderma and normalized by near-infrared mediated hyperthermia. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31(6): 799-806.
7. Ширшев С.В., Бахметьев Б.А., Горбунова О.Л. Роль репродуктивных гормонов в формировании клеточноопосредованных и гуморальных иммунных реакций. *Бюллетень Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук* 2003; 3: 93-6.
8. Shirshov S., Kuklina E., Yarilin A. Reproductive hormones in the regulation of apoptosis of neutrophils. *Biochemistry* 2003; 68(6): 688-95.
9. Картун Л.В., Ходосовская Е.В., Чумаков В.Н. К оценке различий плазменного и сывороточного уровней половых стероидных гормонов и кортизола в свете данных о гормондепонирующей функции эритроцитов. *Белорусский медицинский журнал* 2006; 2(16): 49-51.
10. Yavuz S., Ozilhan G., Elbir Y. et al. Activation of neutrophils by testosterone in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25 (Suppl. 45): S46-51.
11. Molloy E., O'Neill A., Grantham J. et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood* 2003; 102: 2653-9.
12. Lamote I., Meyer E., Duchateau L., Burvenich C. Influence of 17beta-estradiol, progesterone, and dexamethasone on diapedesis and viability of bovine blood polymorphonuclear leukocytes. *J Dairy Sci* 2004; 87(10): 3340-9.
13. Kanda N., Watanabe S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. *J Dermatol Sci* 2005; 38(1): 1-7.
14. Птушкин В.В. Роль гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов в лечении инфекции при нейтропении. *Современная онкология* 2001; 3: 102-4.
15. Derouet M., Thomas L., Cross A. et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem* 2004; 279(26): 26915-21.
16. Choi M., Salanova B., Rolle S. et al. Short-term heat exposure inhibits inflammation by abrogating recruitment of and nuclear factor-(kappa)B activation in neutrophils exposed to chemotactic cytokines. *Am J Pathol* 2008; 172(2): 367-77.
17. Montecucco F., Steffens S., Burger F. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal* 2008; 20(3): 557-68.
18. Cutolo M., Capellino S., Sulli A. et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 538-47.
19. Stevenson S., Nelson L., Sharpe D., Thornton M. 17beta-estradiol regulates the secretion of TGF-beta by cultured human dermal fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008; 19(8): 1097-1109.
20. Florian M., Freiman A., Magder S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids* 2004; 69: 779-87.
21. Juliet P., Hayashi T., Daigo S. Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1693(3): 185-91.