

ИЗУЧЕНИЕ АПОПТОЗА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Овсепян Л.М.¹, Казарян Г.С.¹, Зангинян А.В.¹, Акопджанян А.А.¹,
Захарян Г.В.¹, Петрек Мартин²

¹ Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

² Университет Палацкого, Оломоуц, Чешская Республика

Резюме. Сахарный диабет 1 типа (СД-1) характеризуется прогрессирующей деструкцией β -клеток поджелудочной железы. Ведущими звеньями в патогенезе диабета являются дисрегуляция иммунитета и запрограммированная гибель клеток. В данной статье изучены особенности экспрессии генов IL-2, белка Bcl-1 и аннексина 11 у больных СД-1. Исследование проведено на 70 здоровых людях и 30 больных СД-1. Обратную транскрипцию проводили ПЦР с помощью Transcriptor first strand cDNK synthesis Kit.

Изучение уровня экспрессии гена IL-2 и белка Bcl-1 в лейкоцитах периферической крови показало, что медианные уровни экспрессии гена IL-2 и белка Bcl-1 повышены у больных СД-1 по сравнению с контрольной группой. Изучение апоптоза с помощью аннексинового теста обнаружило повышенный уровень экспрессии аннексина 11 у больных СД-1. Полученные данные могут служить дополнительным источником для понимания механизмов патогенеза СД-1.

Ключевые слова: диабет, лейкоциты, интерлейкин-2, аннексин, пролиферация, апоптоз

STUDY OF APOPTOSIS OF IMMUNE CELLS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Hovsepyan L.M.^a, Kazaryan G.S.^a, Zanginyan A.V.^a,
Akopdzhanyan A.A.^a, Zakharyan G.V.^a, Petrek M.^b

^a Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

^b Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Abstract. Type 1 diabetic mellitus (T1DM) is known to be associated with progressive destruction of β -cells of the pancreas. Dysregulated immunity and programmed cell death are an important link in pathogenesis of diabetes. In this study, we examined expression levels of interleukin-2, Bcl-1, ANXA-11 genes in patients with T1DM. The study was done with blood leukocytes of T1DM patients (30) and healthy controls (70).

Адрес для переписки:

Овсепян Лаура Михайловна
Институт молекулярной биологии Национальной
академии наук Республики Армения
Тел.: +0374 (091) 14-64-88.
E-mail: lhovsep@mail.ru

Address for correspondence:

Hovsepyan Laura M.
Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences,
Republic of Armenia
Phone: +0374 (091) 14-64-88.
E-mail: lhovsep@mail.ru

Образец цитирования:

Л.М. Овсепян, Г.С. Казарян, А.В. Зангинян,
А.А. Акопджанян, Г.В. Захарян, Мартин Петрек
«Изучение апоптоза иммунных клеток при сахарном
диабете 1 типа» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19,
№ 5. С. 635-640.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640
© Овсепян Л.М. и соавт., 2017

For citation:

L.M. Hovsepyan, G.S. Kazaryan, A.V. Zanginyan,
A.A. Akopdzhanyan, G.V. Zakharyan, Martin Petrek "Study of
apoptosis of immune cells in type 1 diabetes mellitus", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 5, pp. 635-640.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640

Reverse-transcription PCR was done with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit from Roche Life Science. The study of IL-2 and Bcl-1 gene expression level in peripheral blood leukocytes indicated that the median gene expression levels of IL-2 and Bcl-1 are increased in patients with T1DM patients compared with control group of healthy persons.

The study of apoptosis by annexin test has revealed an increased level of ANXA 11 expression in T1DM patients. The obtained data can serve as an additional source for understanding the pathogenesis of T1DM mechanisms.

Keywords: diabetes, leukocytes, interleukin-2, annexin, proliferation, apoptosis

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет собой заболевание, проявляющееся яркими нарушениями углеводного и энергетического обмена, сопровождающееся дисбалансом всех функциональных систем организма в результате хронической гипергликемии.

Считается, что сахарный диабет 1 типа (СД-1) является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием, которое развивается в результате селективного разрушения β -клеток поджелудочной железы цитотоксическими лимфоцитами, Т-хелперами 1 типа и аутоантителами [1]. В результате постепенной деструкции β -клеток наступает инсулиновая недостаточность, приводящая к расстройству гомеостаза глюкозы и возникновению СД-1. Считается, что одним из механизмов развития СД-1 является дефект Т-регуляторной системы, в частности дисбаланс между $CD4^+$ эффекторами и $CD8^+$ Т-лимфоцитами [6].

Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы являются процессы инициации и реализации апоптоза.

Несмотря на активное изучение иммунопатогенеза СД-1, многие ключевые моменты в развитии и прогрессировании данного заболевания остаются неясными.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей экспрессии генов интерлейкина-2 (IL-2), белка Bcl-1(bcl-1) и аннексина 11 (ANXA -11) у больных СД 1 типа.

Материалы и методы

Исследование проведено на 70 здоровых людях и 30 больных сахарным диабетом 1 типа. Все обследованные были этническими армянами, проживающими на территории Армении. Все они были проинформированы врачами о предстоящем исследовании и дали согласие на взятие крови. Исследование одобрено Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА.

Забор крови проводили натощак. Кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Для выделения лейкоцитов к 5 мл цельной крови добавляли 10 мл лизирующего раствора, включающего в свой состав (155 мМ NH_4Cl , 10 мМ $KHCO_3$ и 0,1 мМ Na_2EDTA , pH = 7).

Полученный осадок лимфоцитов дважды промывали PBS (фосфатно-солевого буфера, pH = 7,4), а затем хранили при $-20^\circ C$ в растворе, состоящем из 100 мкл RNeasyLysis и 50 мкл PBS.

Выделение РНК из лимфоцитов, проводили при использовании коммерческого набора реагентов ("High pure mRNA Isolation Kit"; Roche Applied Science, Германия). Выделенную РНК

ТАБЛИЦА 1. ЗОНДЫ И ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

TABLE 1. PROBES AND PRIMERS USED IN QUANTITATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION LEVEL

Ген Gene	Правый праймер Right primer	Левый праймер Left primer	Номер зонда Probe No.	Изготовитель Manufacturer
IL2	5'-aagtgaagttttgcttgagc	5'-aggccacagaactgaaacac	#65	Roche
ANXA11	5'-tcttcccagacacacacc	5'-ggccttctgctgctcata	#29	Roche
Bcl-2	5'-ttattcatgaggcaggtattattag	5'acagaggatcatgctgtacttaaaaa	#6	IDT
RPL32	5'-gcatctcggcacagtaag	5'-gaagtcctgtccacaacg	#17	IDT

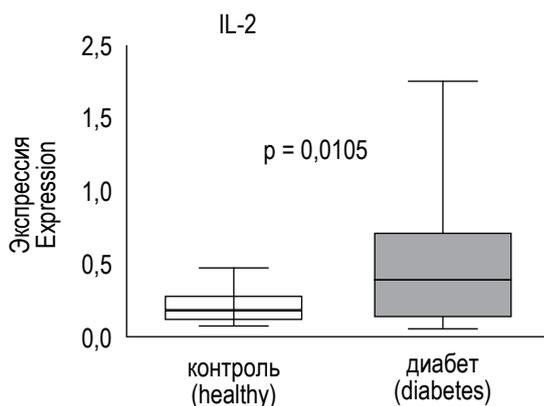


Рисунок 1. Уровень экспрессии IL-2 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 1. Expression level of IL-2 in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median shown

хранили при -80°C до обратной транскрипции ПЦР.

Обратную транскрипцию проводили ПЦР с помощью Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit согласно инструкции протокола. Полученные кДНК хранили при -30°C [11].

RPL32 использовали в качестве контрольного гена для ПЦР в реальном времени. Информация о праймерах – в таблице 1.

ПЦР в реальном времени и предварительный анализ полученных результатов были сделаны на системе RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism 5 Demo (<http://www.graphpad.com>). Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартной ошибки ($M \pm m$). При установлении достоверности различий данных использовали t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна–Уитни.

Значение $p < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное.

Результаты и обсуждение

Сравнительное изучение уровня экспрессии гена IL-2 в лейкоцитах периферической крови показало, что медианные уровни экспрессии гена IL-2 повышены у больных СД-1 по сравнению со здоровыми (рис. 1).

IL-2 обладает выраженной способностью индуцировать активность практически всех клонов цитотоксических клеток. Он был первым интерлейкином, у которого была выявлена эта способность. IL-2 повышает цитолитическую функцию Т-киллеров и NK-клеток, увеличивает

продукцию перфоринов и IFN γ этими клетками, активирует моноциты и макрофаги, которые повышают синтез и секрецию TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8. Основными продуцентами IL-2 являются активированные Т-хелперы 1-го класса. Главное действие, оказываемое им на Т-лимфоциты, – индукция пролиферации в результате преодоления точки рестрикции между фазами цикла G1a и G1b [7].

Интерес вызывает участие этого цитокина в процессе апоптоза. Обнаружено, что для реализации апоптозиндуцирующего эффекта IL-2 на лимфоциты крови в условиях *in vitro* необходим определенный порог концентрации цитокина. Наличие подобного «барьера» действия IL-2 может быть объяснено строением его рецептора и работой внутриклеточных сигнальных путей. Согласно некоторым исследователями, указанный цитокин вызывает повышение чувствительности Т-лимфоцитов к апоптозу, что зависит от уровня антигенного и костимулирующего воздействия; IL-2 человека оказывает также дозозависимые эффекты на реализацию апоптоза иммунокомпетентных клеток: количество апоптотических клеток в культуре лимфоцитов изменяется однонаправленно с концентрацией цитокина в диапазоне 0,1–1,0 нг/мл [4]. Существует множество причин отмены апоптоза данным цитокином. Одна из них – способность данного цитокина запускать пролиферативный каскад по MAPK-сигнальным путям, сходящимся на регуляции экспрессии гена bcl-2, результатом повышения которой является клеточное выживание и пролиферация. Дозозависимый характер этого явления может быть объяснен увеличением количества активированных IL-2R с повышением дозы цитокина и усилением интенсивности антиапоптотических сигнальных путей в клетке [4].

В литературе имеются противоречивые сведения о повышении или снижении продукции уровня IL-2 при СД-1. У больных с недавно диагностированным СД-1 отмечается более высокий уровень циркулирующего IL-2 в периферической крови по сравнению с длительно текущим СД 1 типа и здоровыми.

В то же время имеются работы, в которых сообщается о снижении продукции уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарами у больных СД-1 [10].

Одним из важных регуляторов апоптоза являются белки семейства bcl-2.

Bcl-2 является внутриклеточным белком, локализующимся на митохондриях, поэтому появ-

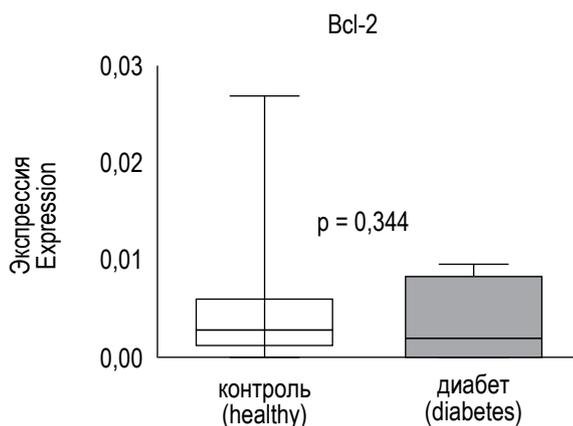


Рисунок 2. Уровень экспрессии Bcl-2 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 2. The level of Bcl-2 expression in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median shown

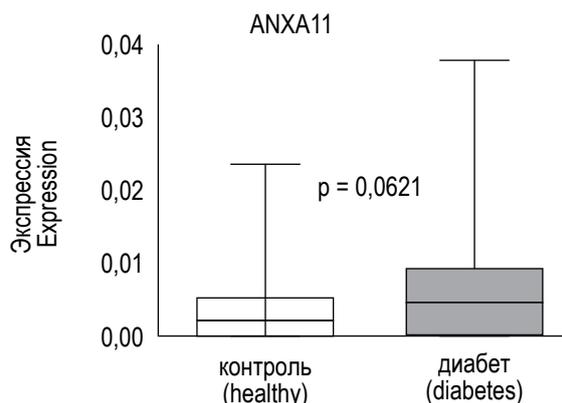


Рисунок 3. Уровень экспрессии ANXA-11 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 3. Expression level for ANXA-11 in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median

ление его растворимой формы в крови связано с повреждением клеточной мембраны в результате процесса апоптоза.

Как показали результаты наших исследований (рис. 2), при СД-1 наблюдается повышение в крови экспрессии белка bcl-2. Повышенная экспрессия bcl-2 повышает выживаемость клеток, индуцированных к апоптозу. Bcl-2 взаимодействует с Араф-1 и каспазой-9 и блокирует дальнейшую передачу апоптотического сигнала [13].

Механизмы, с помощью которых модулируется апоптотический процесс, неизвестны, и предлагается несколько противоречивых теорий о способах действия белков семейства bcl-2. Одна из теорий основана на блокаде апоптоза bcl-2 путем изменения митохондриальных функций.

Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки, который может осуществляться за счет повышения проницаемости митохондриальной мембраны, приводящей к открытию высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий. Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объема митохондриального матрикса. Данный процесс связывают с раскрытием пор митохондриальной мембраны, приводящим к снижению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий [2].

Апоптоз, наряду с пролиферацией, является формой ответа зрелых лимфоцитов на патологию, эти реакции альтернативны, их параллельная оценка может дать более полные сведения о состоянии изучаемых клеток [5].

В этой связи нами был изучен уровень аннексина 11 в лимфоцитах больных СД-1. Как показали результаты исследования (рис. 3), нами обнаружен повышенный уровень экспрессии аннексина 11 по сравнению с контрольной группой.

Аннексин-11 не выделяется из нормальных клеток, источником внеклеточного аннексина являются апоптотические и разрушенные клетки [12]. В механизме действия аннексина большое значение имеет их свойство связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами – фосфатидилсеринем (ФС) и кардиолипином (КЛ), экспозиция которых на клеточной мембране является одним из ранних признаков апоптоза [8].

Результаты наших прежних исследований, посвященных исследованию перекисей липидов и содержания фосфолипидов, показали уменьшение ФС и КЛ при аллоксановом диабете и активирование процессов свободнорадикального окисления липидов [3].

Наиболее легко подвергаются свободнорадикальному окислению кислые фосфолипиды. Образование гидроперекисей ФС и КЛ нарушает его взаимодействие с белками цитоскелета аннексинами и облегчает миграцию окисленного ФС с внутренней стороны мембранного бислоя на наружную. По этой причине ФС, который в нормальной клетке практически полностью локализован с внутренней стороны бислоя, при индукции апоптоза начинает проявляться и с внешней стороны мембраны [2]. Экспрессия фосфатидилсерина на наружной поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза до полной деградации клетки.

КЛ в основном содержится на внутренней стороне мембраны митохондрий и играет специфическую роль в функционировании митохондрий за счет взаимодействия с рядом митохондриальных белков, а также в регуляции активностей ферментных систем дыхательной цепи. Известно, что АТФ-АДФ-синтетаза находится в окружении КЛ, отщепление КЛ сопровождается торможением активности цитохромоксидазы, активности сукцинатдегидрогеназы, расстройством структурной организации НАДН-дегидрогеназы.

В нормальных условиях КЛ удерживают цитохром С. При активации свободнорадикального окисления в митохондриях кардиолипины окисляются и освобождают цитохром С. После выхода в цитоплазму он образует комплекс с фактором активации апоптоза (АраF-1), активирующей нижестоящие каспазы, которые осуществляют апоптоз клеток [9].

Таким образом, полученные нами результаты позволяют считать, что у больных СД-1 отмечается повышение экспрессии генов IL-2, Vcl-2

и Анха-11. Нам представляется, что дисбаланс между пролиферацией и запрограммированной гибелью клетки приводит к нарушению регуляторной функции цитокинов, что является патологическим звеном в патогенезе СД-1, что, скорее всего, связано с компенсаторной реакцией организма на активацию иммунной системы и апоптоза.

Обобщая результаты проведенного исследования, можно заключить, что изучение экспрессии отмеченных генов важно с точки зрения раскрытия иммунопатогенеза СД-1 и определения их прогностической значимости в процессе проведения лечения. Нами было выявлено, что у больных с СД-1, наряду с изменением процесса пролиферации, отмечались разной степени выраженности изменения апоптотической гибели лимфоцитов крови. Обнаруженные закономерности реализации апоптотической гибели иммунных клеток могут являться результатом модулирующего влияния IL-2 и Vcl-1 и определяются дозой цитокинов.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И. Диабетология. М.: Медицина, 2004. 383 с. [Balabolkin M.I. Diabetology]. Moscow: Medicine, 2004. 383 p.
2. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в запрограммированной гибели клетки: различные механизмы гибели // Биохимия, 2005. Т. 70, № 2. С. 284-293. [Bra M., Kvinan B., Suzin S.A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2005, Vol. 70, no. 2, pp. 231-239. (In Russ.)]
3. Карян Ш.С., Овсепян, Л.М., Захарян Г.В., Карагезян К.Г. Особенности нормализующего действия лазерного излучения при нарушениях метаболизма фосфолипидов и процессов перекисеобразования у аллоксандиабетических белых крыс // Информационные технологии и управление, 2003. Т. 2. С. 212-218. [Karyan Sh.S., Hovsepyan L., Zakharyan G., Karagezyan K.G. Specificities of laser irradiation normalizing effect at disturbances of phospholipid metabolism and peroxideformation processes of alloxandibetted rats. *Informatsionnye tekhnologii i upravlenie = Informaton Technologies and Management* 2003, Vol. 2, pp. 212-218. (In Russ.)]
4. Саприна Т.В., Лазаренко Ф.Э., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Особенности продукции интерлейкина-2 мононуклеарными лейкоцитами крови при аутоиммунном сахарном диабете // Сибирский медицинский журнал, 2011. Т. 26, № 4. С. 65-70. [Saprina T.V., Lazarenko F.E., Prokhorenko T.S., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Peculiarities of production and reception features of interleukin 2 by mononuclear leukocytes in autoimmune diabetes mellitus. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2011, Vol. 26, no. 4, pp. 65-70. (In Russ.)]
5. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клиникоиммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopatological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
6. Сноп М., Welsh N., Jonas J.C., Jörns A., Lenzen S., Eizirik D.L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 2005, Vol. 54, pp. 97-107.
7. Eguchi Katsumi, Kawakami A. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Medical Electron Microscopy*, 2002, Vol. 35, Issue 1, pp. 1-8.
8. Fadok V., Rose D. M., Pearson A. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 2000, Vol. 405, pp. 85-90.
9. Green D.R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, 2005, Vol. 121, pp. 671-674.

10. Hussain M.J., Maher J., Warnock T., Vats A., Peakman M., Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia*, 1998, Vol. 41. no. 3, pp. 343-349.
11. Mull A. Reverse transcription: do the flip. *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.*, 2008, Vol. 9, pp. 501-505.
12. Wang J., Guo C., Liu S., Yin Y., Liang R., Sun M.Z., Frederick G. Annexin A-11 in disease. *Clin. Chim. Acta*, 2014, Vol. 431, pp. 164-168.
13. Xu H., Chen Y., Li Y., Xia F., Han B., Zhang H., Zhai H., Wu H., Li Y., Lu Y. Mitochondrial apoptosis of lymphocyte is induced in type 2 diabetes. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2014, Vol. 127, no. 2, pp. 213-217.

Авторы:

Овсебян Л.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

Казарян Г.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

Зангинян А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

Акопджанян А.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

Захарян Г.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

Петрек Мартин — заведующий лабораторией патофизиологии, Университет Палацкого, Оломоуц, Чешская Республика

Authors:

Hovsepyan L.M., PhD (Biology), Leading Research Associate, Chief, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

Kazaryan G.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

Zanginyan A.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

Akopdzhanyan A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

Zakharyan G.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia

Petrek Martin, Head of Laboratory, Department of Pathophysiology, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Поступила 25.01.2017
Отправлена на доработку 09.02.2017
Принята к печати 27.02.2017

Received 25.01.2017
Revision received 09.02.2017
Accepted 27.02.2017