

УДК [611.018.5:576.367:616.153.915]:612.018

## УЧАСТИЕ ЛЕПТИНА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ У ЛИЦ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ

© 2015 г. О. А. Ставинская, С. Н. Балашова

Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, г. Архангельск

Изучены показатели программируемой клеточной гибели (апоптоза) иммунокомпетентных клеток периферической крови в условиях различного уровня лептина у лиц с дислипидемией. Исследование проводили с соблюдением основных норм биомедицинской этики. Для реализации поставленной цели были выделены две группы обследуемых лиц: с условно повышенным ( $>25$  нг/мл,  $n = 13$ ) и условно пониженным ( $<10$  нг/мл,  $n = 13$ ) содержанием в крови лептина. Группы были практически равноценны по возрасту ( $52,5 \pm 1,4$ ) и ( $50,7 \pm 2,4$ ) года и полу (женщины). Апоптоз лимфоцитов оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченного аннексина V (Beckman Coulter, США). Определение концентраций лептина, цитокинов и IgE в крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. В мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе, изучали моноцитогамму и нейтрограмму. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом двойной пероксидазной метки с использованием моноклональных антител. Тип исследования ретроспективный, выборки случайные, одномоментные. Генеральная совокупность – жители севера европейской территории России. Границы нормального распределения количественных показателей определяли при помощи критерия Шапиро – Уилка. Достоверность различий между группами оценивали с помощью параметрического  $t$ -критерия Стьюдента и критерия Уилкоксона. Установлено, что при повышении содержания лептина нарастает дифференцировка и апоптоз лимфоцитов и нейтрофилов; интенсивность апоптоза и пролиферации моноцитов не меняется, но усиливаются процессы их созревания и активизации. На этом фоне увеличиваются концентрации IgE и IFN- $\gamma$ , что также ассоциировано с накоплением лептина в крови.

**Ключевые слова:** дислипидемия, апоптоз, пролиферация, лимфоцит, нейтрофил, моноцит

## THE INVOLVEMENT OF LEPTIN IN THE REGULATION OF PROGRAMMED CELL DEATH IN PERSONS WITH DYSLIPIDEMIA

O. A. Stavinskaya, S. N. Balashova

Institute of Environmental Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia

Indicators of programmed cell death (apoptosis) of immunocompetent cells of peripheral blood in the conditions of various level of a leptin at persons with a dyslipidemia are studied. Research was conducted with observance of the main standards of biomedical ethics. For realization of a goal two groups of the examined persons were allocated: with conditionally raised ( $>25$  ng/ml,  $n = 13$ ) and conditionally lowered ( $<10$  ng/ml,  $n = 13$ ) the content in blood of a leptin. Groups were almost equivalent on age ( $52,5 \pm 1,4$ ) and ( $50,7 \pm 2,4$ ) years and a sex (woman). Apoptosis of lymphocytes was estimated by method of a flowing laser tsitoflyuorimetriya with use FITC-marked of an annekxin of V ("Beckman Coulter", USA). Determination of concentration of a leptin, cytokin and IgE carried out to blood by method of the solid-phase immunoferramental analysis. In dabs of blood painted according to Romanovsky-Gimz studied a monocytoqramma and to a neutroqramma. The maintenance of phenotypes of lymphocytes was determined by method of a double peroksidazny tag with use of monoclonal antibodies. Research type retrospective, selections casual, one-stage. Population - inhabitants of the north of the European territory of Russia. Borders of normal distribution of quantitative indices defined by means of Shapiro criterion - Uilka. Reliability of distinctions between groups was estimated by means of parametrical  $t$ -criterion of Student and Uilkokson criterion. It is established that at increase of the maintenance of a leptin the differentiation and apoptosis of lymphocytes and neutrophils accrues; intensity of apoptosis and proliferation of monocytes does not change, but processes of their maturing and activization amplify. On this background concentration of IgE and IFN- $\gamma$  that is also associated with accumulation of a leptin in blood increase.

**Keywords:** dyslipidemia, apoptosis, proliferation, lymphocyte, neutrophil, monocyte

### Библиографическая ссылка:

Ставинская О. А., Балашова С. Н. Участие лептина в регуляции программируемой клеточной гибели у лиц с дислипидемией // Экология человека. 2015. № 12. С. 34–37.

Stavinskaya O. A., Balashova S. N. The Involvement of Leptin in the Regulation of Programmed Cell Death in Persons with Dyslipidemia. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2015, 12, pp. 34-37.

Лептин производится клетками жировой ткани адипоцитами и представляет собой белок молекулярной массой 16 кДа, важной функцией которого является регулирование энергетического баланса и массы тела организма [7]. Данный гормон увеличивает интенсивность липолиза за счет активизации ферментов малатдегидрогеназы, липопроотеинлипазы и Jak/STAT [16], стимулирует фосфорилирование

AMФК $\alpha$  [14], уменьшает содержание триглицеридов и секрецию их в печени [10]. Влияние лептина на иммунологическую реактивность, в частности на программируемую клеточную гибель (апоптоз), изучено в меньшей степени и ограничено результатами исследования гранулоцитов, дендритных клеток и CD4+ лимфоцитов. Так, по отношению к эозинофилам и базофилам лептин выступает как фактор

выживания, предотвращая расщепление белков Вах и выход цитохрома с из митохондрий [5, 17]. При добавлении к дендритным клеткам лептин подавляет их апоптоз, индуцированный ультрафиолетом, путем фосфорилирования STAT-3, активизации NF-κB и регуляции экспрессии bcl-2 и bcl-xL генов [13]. Гормон вызывает пролиферацию CD4+CD45RA+ лимфоцитов, но препятствует увеличению количества CD4+CD45RO+ Т-клеток [11]. В связи с этим целью исследования явилось изучение особенностей программируемой гибели моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов крови у лиц с дислипидемией.

### Методы

Проведено обследование 28 больных метаболическим синдромом. Диагноз поставлен врачами городского эндокринологического консультативного центра г. Архангельска. Исследование проводили с соблюдением основных норм биомедицинской этики. Для изучения взаимосвязи уровня лептина и состояния программируемой клеточной гибели в условиях дислипидемии были выделены две группы обследуемых лиц: с условно повышенным (>25 нг/мл, n = 13) и условно пониженным (<10 нг/мл, n = 13) содержанием в крови лептина — медиана составляет 39,3 (32,2–45,2) и 8,6 (7,1–9,4) нг/мл соответственно, p < 0,001. Группы были практически равноценны по возрасту (52,5 ± 1,4) и (50,7 ± 2,4) года и полу (женщины).

Концентрацию цитокинов IL-6, IL-10, TNF-α и IFN-γ в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (Invitrogen, США). Данным методом также выявляли уровни лептина и IgE в крови, используя реактивы компаний DRG и Dr. Focke (Германия). Реакцию оценивали с помощью фотометра Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм. Исследование уровня инсулина осуществлялось реактивами фирмы DRG на автоматическом иммуноферментном анализаторе Evolis фирмы «Био-Рад» (Германия). Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом двойной пероксидазной метки с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия). Показатели липидного обмена (общий холестерин, триглицериды, АПО В) изучали в сыворотке крови на биохимическом анализаторе Stat fax 1904 Plus реагентами фирмы Human (Германия). В мазках крови, окрашенных по Романовскому — Гимзе, кроме лейкограммы определяли моноцитограмму и нейтрограмму. В составе моноцитограмм устанавливали содержание промоноцитов, моноцитов и полиморфноядерных моноцитов. Нейтрофильные гранулоциты дифференцировали по содержанию фрагментов ядра, где выраженность апоптоза определяли по количеству нейтрофилов с пятью и более сегментами. Программируемую гибель лимфоцитов периферической крови оценивали с помощью FITC-аннексина-V, специфически связывающегося с участками фосфатидилсерина на мембранах апоптозных клеток, и

пропидиума йодида, позволяющего дифференцировать клетки с интактной и проницаемой мембраной. Анализ апоптотически измененных лимфоцитов AnV+/PI— проводился на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США).

Результаты исследования обработаны с использованием пакета прикладных программ Statistica 6 (StatSoft, США). Тип исследования ретроспективный, выборки случайные, одномоментные. Генеральная совокупность — жители севера европейской территории России. Границы нормального распределения количественных показателей определяли при помощи критерия Шапиро — Уилка. При анализе полученных результатов использовали среднее значение и стандартное отклонение, медиану и нижний, верхний квартили. Достоверность различий между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента для независимых выборок и непараметрического критерия Уилкоксона. Статистическая достоверность присваивалась при значении p < 0,05.

### Результаты

Установлено, что при увеличении концентрации лептина растет индекс массы тела с (27,4 ± 0,76) до (36,4 ± 2,05) кг/м<sup>2</sup> и уровень инсулина в крови с (12,2 ± 1,09) до (14,4 ± 1,04) мЕд/мл, p = 0,025. Повышается и медиана содержания общего холестерина, триглицеридов соответственно с 4,9 (4,1–6,3) до 6,1 (5,9–6,7) моль/л, p = 0,045; и с 2,1 (1,1–4,3) до 3,1 (2,4–3,6) моль/л, p = 0,47 и АпоВ (рис. 1).

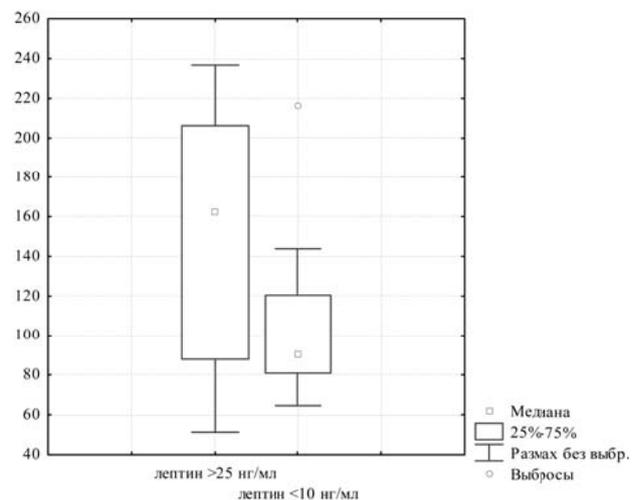


Рис. 1. Содержание АпоВ периферической крови в условиях различного уровня лептина у лиц с дислипидемией

В условиях нарастания уровня сывороточного лептина меняется и динамика иммунологической реактивности обследуемых лиц. Так, увеличивается общее количество лейкоцитов с (5,46 ± 0,26) до (6,56 ± 0,31) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,039, за счет нейтрофилов с (2,95 ± 0,19) до (3,66 ± 0,22) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,036, и лимфоцитов с (1,92 ± 0,16) до (2,29 ± 0,16) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,038. Последние повышают экспрессию молекул активации (CD3+, CD25+),

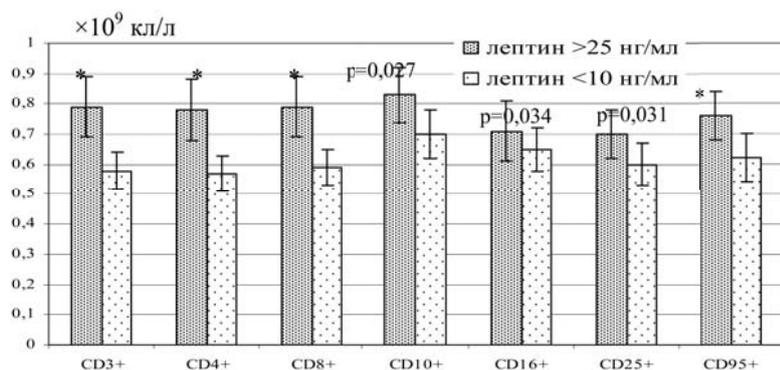


Рис. 2. Содержание фенотипов лимфоцитов периферической крови в условиях различного уровня лептина у лиц с дислипидемией  
Примечание. \* – p < 0,001 по отношению к группе с пониженным содержанием лептина.

дифференцировки (CD4+, CD8+), пролиферации и готовности к апоптозу (CD10+, CD95+); увеличивается содержание натуральных киллеров (рис. 2). Все это отражается на процессе программируемой гибели лимфоцитов, так как увеличивается число апоптотических клеток AnV+/PI- с 5,8 (3,8–9,1) до 8,9 (4,2–15,4) %, p = 0,043.

При исследовании нейтрограммы лиц с повышенной концентрацией лептина выявлено увеличение количества клеток с тремя, четырьмя, пятью и более сегментами ядра (рис. 3). Относительно нейтрофилов с двумя фрагментами ядра не установлено статистически значимых различий (p = 0,072), однако есть тенденция к повышению палочкоядерных форм с (0,17 ± 0,02) до (0,22 ± 0,04) × 10<sup>9</sup> кл/л. На этом фоне не меняется фагоцитарная активность гранулоцитов (27,2 ± 3,06) и (28,5 ± 3,5) %, p = 0,064, но снижается интенсивность данного процесса с (4,5 ± 0,69) до (3,6 ± 0,35) ед/кл, p = 0,021.

Наращение количества лептина ассоциировано с повышением общего содержания моноцитов с 0,29 (1,16–0,66) до 0,39 (0,32–0,52) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,013, что происходит в основном за счет зрелых моноцитов – 0,18 (0,14–0,23) и 0,09 (0,06–0,19) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,024, и не затрагивает уровни промоноцитов и полиморфноядерных клеток – соответственно 0,14 (0,09–0,19) и 0,11 (0,06–0,31) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,075; 0,08 (0,05–0,13) и 0,07 (0,06–0,15) × 10<sup>9</sup> кл/л, p = 0,078.

Изменение цитокинового профиля реализуется посредством IFN-γ и IL-10 (таблица), содержание TNF-α и IL-6 не имело статистически значимых различий (p = 0,068 и p = 0,059). Установлено, что с повышением количества лептина в крови значительно

увеличивается уровень IgE с 16,7 (12,1–44,7) до 73,9 (40,7–136,1) МЕ/мл, p = 0,001.

**Содержание цитокинов крови у лиц с дислипидемией при различной концентрации лептина, Ме (25–75)**

Цитокины, пг/мл	Лептин >25 нг/мл	Лептин <10 нг/мл
IL-6	8,3(6,7–10,9)	8,5(6,4–10)
IL-10	22,7(18,6–51,4)	19,6(15,1–28,3)
IFN-γ	18(4–30)	15,5(10–55)
TNF-α	27,9(25,8–30,1)	26,9(25,3–29,5)

**Обсуждение результатов**

С увеличением индекса массы тела и дислипидемии нарастает концентрация лептина в крови, что ассоциировано с интенсификацией всей последовательности клеточных событий (пролиферация, активизация, дифференцировка, антителообразование и апоптоз) у лимфоцитов и нейтрофилов. Известно, что лептин является структурным гомологом семейства цитокинов, включающих IL-6, IL-11, IL-12, лейкозингибирующий фактор (LIF) и G-CSF [18]. Рост пролиферации лимфоцитов ведет к повышению их общего содержания и закономерному апоптозу избыточно активированных и дифференцированных клеток. Пролиферативный эффект со стороны лептина достигается путем включения каскадных реакций JAK-STAT, IRS-1-PI3K и MAPK киназ, что стимулирует тирозин-фосфорилирование белка Sam68, участвующего в диссоциации РНК [15]. Нельзя исключать возможности потенциального действия лептина на все этапы жизненного цикла клетки, так как показано наличие рецепторов к лептину (OB-Rb) на мембране лимфоцитов, моно-

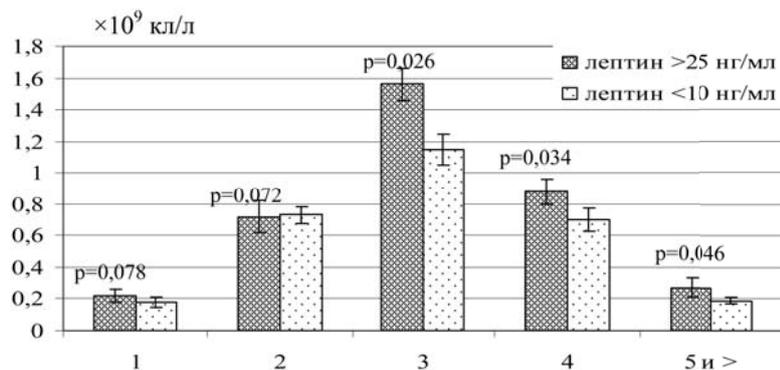


Рис. 3. Нейтрограмма периферической крови лиц с дислипидемией в условиях различной концентрации лептина  
Примечание. По горизонтали – количество сегментов ядра нейтрофила.

цитов и нейтрофилов [6]. Однако данное утверждение мы можем подтвердить относительно лимфоцитов и нейтрофилов; система моноцитов проявляет чувствительность к лептину лишь в момент активизации и функциональной зрелости без изменения со стороны пролиферирующих и апоптотических клеток.

В литературе широко представлены сведения об ингибирующем влиянии лептина на программируемую гибель лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов [3, 8, 12, 15]. В основном указанные исследования касаются опытов *in vitro* без учёта дислипидемии. Этим мы объясняем разницу в полученных результатах. Если же рассматривать дислипидемию как фактор регуляции апоптоза, то существуют данные о нарушениях работы митохондрий лимфоцитов, вызванных накапливающимися хромосомными абберациями и укорочением теломер под влиянием дислипидемии [2, 4]. В частности, избыточные концентрации триглицеридов вызывают апоптоз макрофагов за счет повышения уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  и реактивных кислородных радикалов, выхода цитохрома с из митохондрий, локализации AIF в ядре и активизации белков Вах. Процесс сопровождается появлением молекул фосфатидилсерина на плазматической мембране, расщеплением каспазы-3 и поли(АДФ-рибозы)-полимеразы [1].

В нашем исследовании у лиц с дислипидемией отмечается повышение в крови уровня IFN- $\gamma$  как в квартильном, так и среднем выражении с ( $20,3 \pm 4,37$ ) до ( $37,7 \pm 6,47$ ) пг/мл,  $r = 0,036$ , что подтверждает факт лептинзависимой дифференцировки Т-хелперов в направлении Th 1 типа с преимущественным синтезом IFN- $\gamma$  и IL-2 [12]. Выявленное увеличение количества IgE свидетельствует об активизации антителообразования, что также ассоциировано с накоплением лептина в крови [9].

Таким образом, под действием дислипидемии нарастает концентрация лептина в крови, гормон стимулирует пролиферацию лимфоцитов и нейтрофилов: увеличивается общее количество данных клеток, нарастают процессы дифференцировки и, как следствие, активизируется апоптоз. В условиях избыточного количества лептина не меняется интенсивность апоптоза и пролиферации моноцитов, однако усиливается их созревание и активизация.

#### Список литературы / References

1. Aflaki E., Radović B., Chandak P. G. Triacylglycerol accumulation activates the mitochondrial apoptosis pathway in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, pp. 7418-7428.
2. Boehm B. O., Möller P., Högel J. Lymphocytes of type 2 diabetic women carry a high load of stable chromosomal aberrations: a novel risk factor for disease-related early death. *Diabetes.* 2008, 57, pp. 2950-2957.
3. Bruno A., Conus S., Schmid I., Simon H. U. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J. Immunol.* 2005, 174, pp. 8090-8096.

4. Buxton J. L., Walters R. G., Visvikis-Siest S. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J. of Clin. Endocrinol. & Metabolism.* 2011, 96, pp. 1500-1505.

5. Conus S., Bruno A., Simon H. U. Leptin is an eosinophil survival factor. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 116, pp. 1228-1234.

6. Fantuzzi G., Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 2000, 68, pp. 437-446.

7. Friedman J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr. Rev.* 2002, 60, pp. S1-S14.

8. Fujita Y., Murakami M., Ogawa Y., Masuzaki H., Tanaka M., Ozaki S., Nakao K., Mimori T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 2002, 128, pp. 21-26.

9. Guler N., Kurerler E., Ones U., Tamay Z., Salmayenli N., Darendeliler F. Leptin: does it have any role in childhood asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 114, pp. 254-259.

10. Huang W., Dedousis N., Bandi A., Lopaschuk G. D., O'Doherty R. M. Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin *in vivo*. *Endocrinology.* 2006, 147, pp. 1480-1487.

11. Lord G. M., Matarese G., Howard J. K., Bloom S. R., Lechler R. I. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J. Leukocyte Biol.* 2002, 72, pp. 330.

12. Martin-Romero C., Santos-Alvarez J., Goberna R., Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 2000, 199, pp. 15-24.

13. Mattioli B., Straface E., Quaranta M. G. Leptin Promotes Differentiation and Survival of Human Dendritic Cells and Licenses Them for Th1 Priming. *J. Immunol.* 2005, 174, pp. 6820-6828.

14. Minokoshi Y., Kim Y. B., Peroni O. D., Fryer L. G., Muller C., Carling D., Kahn B. B. Leptin stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002, 415, pp. 339-343.

15. Sánchez-Margalet V., Martín-Romero C., Santos-Alvarez J., Goberna R., Najib S. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin. Exp. Immunol.* 2003, 133 (1), pp. 11-19.

16. Siegrist-Kaiser C. A., Pauli V., Juge-Aubry C. E. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, pp. 2858-2864.

17. Suzukawa M., Nagase H., Ogahara I. Leptin Enhances Survival and Induces Migration, Degranulation, and Cytokine Synthesis of Human Basophils. *J. Immunol.* 2011, 186, pp. 5254-5260.

18. Zhang F., Basinski M. B., Beals J. M. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 1997, 387, pp. 206-209.

#### Контактная информация:

Ставинская Ольга Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов иммунитета ФГБУН Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Ломоносова, 249

E-mail: ifpa-olga@mail.ru