

ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ

Шилов Ю.И.^{1,2}, Шилов С.Ю.^{1,2}, Барков С.Ю.¹, Шилова Н.А.²

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. В 1936 г. канадским патологом Гансом Селье в экспериментах с адреналэктомией было доказано участие гормонов коры надпочечников в развитии акцидентальной инволюции тимуса при стрессе. К 1970-м гг. среди исследователей доминировало представление о лизисе лимфоидных клеток глюкокортикоидами как основном механизме этих изменений. Позже рассматривалась и роль усиления миграции из тимуса Т-лимфоцитов, а также снижения миграции в него костномозговых предшественников, а с 1990-х гг. – индуцированного глюкокортикоидами апоптоза. Для выяснения вклада глюкокортикоидов в те или иные процессы в условиях целостного организма удобным инструментом в экспериментальной эндокринологии и фармакологии является введение самцам крыс или мышам антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристона, известного также как RU-38486 или RU-486. Цель работы – исследование влияния мифепристона при остром стрессе на апоптоз тимоцитов мышей. Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых неинбредных мышей. Мифепристон вводили однократно подкожно за 30 мин до начала иммобилизации в дозе 50 мг/кг массы тела в растворе, приготовленном на стерильном официальном оливковом масле. Контрольным мышам и животным группы сравнения вводили однократно подкожно эквивалентное количество растворителя препарата. Для экспериментального моделирования острого стресса использовали классическую модель 24-часового иммобилизационного стресса в положении на спине в пластиковом рестрейнере. Апоптоз тимоцитов оценивали с помощью проточной лазерной цитометрии с набором реактивов BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) методом, адаптированным для проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte корпорации Millipore. Установлено, что острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)). Введение мифепристона нивелирует эти изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза. Число тимоцитов, находящихся в состоянии раннего апоптоза (т. е. аннексин V-PE-позитивных и 7-AAD-негативных), так же как и общее относительное число клеток, несущих фосфатидилсерин (аннексин V-PE-позитивные тимоциты) при остром стрессе и стрессе на фоне введения мифепристона, не отличаются от контроля.

Ключевые слова: апоптоз, тимоциты, мыши, стресс, мифепристон, RU-38486, RU-486

Адрес для переписки:

Шилов Юрий Иванович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Address for correspondence:

Shilov Yurii I.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.И. Шилов, С.Ю. Шилов, С.Ю. Барков, Н.А. Шилова
«Влияние мифепристона при остром стрессе
на апоптоз тимоцитов мышей» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 345-350.
doi: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

© Шилов Ю.И. и соавт., 2022

For citation:

Yu.I. Shilov, S.Yu. Shilov, S.Yu. Barkov, N.A. Shilova “Effect
of mifepristone under acute stress on thymocyte apoptosis
in mice”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 345-350.
doi: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

DOI: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

EFFECT OF MIFEPRISTONE UNDER ACUTE STRESS ON THYMOCYTE APOPTOSIS IN MICE

Shilov Yu.I.^{a,b}, Shilov S.Yu.^{a,b}, Barkov S.Yu.^a, Shilova N.A.^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. In 1936, the Canadian pathologist Hans Selye, in experiments with adrenalectomy, has shown adrenal cortex hormones to be involved in development of thymic acute involution under stress. By 1970s, the idea of lysis of lymphoid cells by glucocorticoids dominated among researchers as the main mechanism of these changes. Later on, increased migration of T lymphocytes from thymus as well as decreased migration of bone marrow precursors to the thymus were considered. Since 1990s, apoptosis induced by glucocorticoids was also studied in this respect. To elucidate the *in vivo* contribution of glucocorticoids these events, a convenient tool was developed in experimental endocrinology and pharmacology, i.e., treatment of male rats or mice with antagonist of glucocorticoid and progesterone receptors mifepristone, also known as RU-38486 or RU-486. The purpose of this work is to investigate the effect of mifepristone on thymocyte apoptosis in mice under acute stress. Experimental studies were performed in male white noninbred mice. Mifepristone was injected once subcutaneously 30 min before immobilization at a dose of 50 mg/kg body weight prepared in olive oil solution. Control mice and the animals from comparison group were injected once subcutaneously with an equivalent amount of the drug solvent. A classical model of 24-hour immobilization stress in a plastic restrainer (supine position) was used for experimental simulation of acute stress. Thymocyte apoptosis was assessed by flow laser cytometry with BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) reagent kit adapted for Guava EasyCyte flow laser cytometer by Millipore Corporation. It was found that acute stress induced by 24-hour immobilization of mice leads to an increase in the total relative number of 7-AAD-positive cells as well as proportion of cells stained with 7-AAD, but not annexin V-PE (nuclear debris, annexin V(-), 7-AAD (+)). Administration of mifepristone alleviated these changes, thus confirming involvement of glucocorticoids in increasing number of necrotic thymocytes. The number of thymocytes in early apoptosis (i.e., annexin V-PE-positive, 7-AAD-negative), as well as total relative number of cells with phosphatidylserine exposed at the surface (annexin V-PE-positive thymocytes) under acute stress and at stress on the background of the introduction of mifepristone did not differ from the control.

Keywords: apoptosis, thymocytes, mice, stress, mifepristone, RU-38486, RU-486

Исследования проводились в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН» по теме: «Механизмы регуляции иммунной системы» — регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290007-7.

Введение

В 1936 г. канадским патологом Гансом Селье в экспериментах с адреналэктомией было доказано участие гормонов коры надпочечников в развитии акцидентальной инволюции тимуса при стрессе [6]. К 1970-м гг. среди исследователей доминировало представление о лизисе лимфоидных клеток глюкокортикоидами как основном механизме этих изменений [3]. Позже рассматривалась и роль усиления миграции из тимуса Т-лимфоцитов, а также снижения мигра-

ции в него костномозговых предшественников, а с 1990-х гг. — индуцированного глюкокортикоидами апоптоза, что детально изложено в ряде статей [1, 4]. Для выяснения вклада глюкокортикоидов в те или иные процессы в условиях целостного организма удобным инструментом в экспериментальной эндокринологии и фармакологии является введение самцам крыс или мышам антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристона, известного так же как RU-38486 или RU-486 [2].

Цель работы — исследование влияния мифепристона при остром стрессе на апоптоз тимоцитов мышей.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых неинбредных мышей в воз-

расте 24-30 недель. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартной диете (со свободным доступом к пище и воде) и стандартном освещении (12 ч света и 12 ч темноты). Все исследования одобрены на соответствие нормам биомедицинской этики этическим комитетом при «ИЭГМ УрО РАН», протокол № 3 от 30.11.2015 г.

Антагонист глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристон (Mifepristone, Sigma-Aldrich, M8046, син.: 11 β -(4-Dimethylamino)-phenyl-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)-estra-4,9-dien-3-one, RU-38486, RU-486) вводили однократно подкожно за 30 мин до начала иммобилизации в дозе 50 мг/кг массы тела в растворе, приготовленном на стерильном официальном оливковом масле. Контрольным мышам и животным группы сравнения вводили однократно подкожно эквивалентное количество растворителя препарата. Выбор дозы и способа введения мифепристона основывался на ранее проведенных исследованиях [2]. Для экспериментального моделирования острого стресса использовали классическую модель 24-часового иммобилизационного стресса в положении на спине в пластиковом рестрейнере (комбинация эмоционального стресса и чрезмерного физического напряжения) [5, 6].

Для оценки апоптоза тимоцитов методом проточной лазерной цитометрии использовали набор реактивов BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). Суспензию клеток тимуса мышей получали общепринятым методом гомогенизации в пробирках Эппендорф в 1,0 мл полной питательной среды с помощью стерильного полипропиленового пестика (Tissue Grinder, Axygen®). После подсчета исходного числа ядросодержащих клеток (ЯСК) их отмывали центрифугированием и доводили их концентрацию до 1×10^6 ЯСК на 1,0 мл однократного связывающего буфера BD. В связи с тем, что набор реактивов BD содержал те же реагенты, что и набор Guava Nexin® Reagent производителя использованного нами проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte корпорации Millipore, мы модифицировали инструкцию к набору и дальнейший анализ проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя проточного цитометра, что позволило сэкономить реактивы. В опытных пробах смешивали 20 мкл клеток (концентрация 2×10^4 /лунку или 1×10^6 /1,0 мл), приготовленных на однократном связывающем буфере BD с 2 мкл смеси рабочих концентраций аннексина V-PE (PE Annexin V) и 7-аминоактиномицина D (7-AAD), инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, добавляли 180 мкл однократного связывающего буфера BD

в каждую лунку, перемешивали и сразу же анализировали результаты на цитометре. Использовали следующие контроли: 1) неокрашенные клетки на реагентах BD (вместо аннексина V-PE и 7-AAD добавляли такой же объем однократного связывающего буфера BD; контроль аутофлуоресценции, использующийся в качестве негативной пробы для настройки цитометра); 2) клетки, окрашенные только аннексином V-PE (вместо 7-AAD вносили однократный связывающий буфер BD); 3) клетки, окрашенные только 7-AAD (вместо аннексина V-PE вносили однократный связывающий буфер BD). В качестве позитивного контроля в нескольких отдельных экспериментах анализировали показатели тех же клеточных суспензий после естественной гибели клеток при их инкубации в течение 2-3 сут. в полной питательной среде при 40 °С. Анализ проводили в модуле Guava Nexin Assay программного обеспечения Millipore CytoSoft 5.3 для проточного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) по инструкции производителя, получая следующие показатели для каждой клеточной суспензии: 1) процент аннексин V-негативных и 7-AAD-позитивных клеток (Annexin V-negative, 7-AAD-positive; upper left; ядерный дебрис); 2) процент аннексин V-позитивных и 7-AAD-позитивных клеток (Annexin V-positive, 7-AAD-positive; upper right; клетки, находящиеся в состоянии позднего апоптоза и некроза); 3) процент аннексин V-негативных и 7-AAD-негативных клеток (Annexin V-negative, 7-AAD-negative; lower left; живые клетки без признаков апоптоза и некроза); 4) процент аннексин V-позитивных и 7-AAD-негативных клеток (Annexin V-positive, 7-AAD-negative; lower right; клетки, находящиеся в состоянии раннего апоптоза); 5) общий процент аннексин V-позитивных клеток (Annexin V-positive); 6) общий процент 7-AAD-позитивных клеток (7-AAD-positive), а также показатели средней интенсивности флуоресценции (the mean fluorescence intensity, MFI) для каждого из вышеперечисленных параметров в каналах PM1 (Annexin V PE) и PM2 (7-AAD).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ

TABLE 1. EFFECT OF MIFEPRISTONE UNDER ACUTE STRESS ON APOPTOSIS OF MURINE THYMOCYTES

Показатели Parameters	Номер группы и экспериментальное воздействие Number of group and experimental exposure		
	1. Контрольные мыши 1. Control mice (n = 11)	2. Острый стресс 2. Acute stress (n = 14)	3. Острый стресс и мифепристон 3. Acute stress and mifepristone (n = 14)
Ядерный дебрис, Аннексин V(-), 7-AAD (+), % Nuclear debris, Annexin V(-), 7-AAD (+), %	1,327±0,352	4,250±1,119*	2,957±0,746
Клетки в позднем апоптозе, Аннексин V(+), 7-AAD(+), % Late apoptotic cells, Annexin V(+), 7-AAD(+), %	13,864±2,369	19,671±2,605	17,529±2,566
Неповрежденные клетки, Аннексин V(-), 7-AAD(-), % Live, healthy cells, Annexin V(-), 7-AAD(-), %	76,509±2,827	69,543±3,311	71,079±4,016
Клетки в раннем апоптозе, Аннексин V(+), 7-AAD(-), % Early apoptotic cells, Annexin V(+), 7-AAD(-), %	8,300±0,942	6,564±0,821	8,486±1,684
Аннексин V(+) клетки, % Annexin V(+) cells, %	22,191±2,617	26,229±3,211	26,000±3,988
7-AAD(+) cells, %	15,200±2,641	23,936±2,798*	20,443±2,683

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе по критерию Дункана для множественного сравнения между группами; различия между второй и третьей группами статистически не значимы.

Note. *, $p < 0.05$ in relation to the control group according to post-hoc Duncan's test for multiple comparison between groups; differences between the second and third groups are not statistically significant.

к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)) (табл. 1). Процент клеток, находящихся в состоянии раннего апоптоза (т. е. аннексин V-PE-позитивных и 7-AAD-негативных), так же как и общее относительное число клеток, несущих фосфатидилсерин (аннексин V-PE-позитивные клетки), в тимусе стрессированных мышей не отличаются от контроля. Введение мифепристона нивелирует вызванное острым стрессом изменения и соответствующие показатели статистически значимо не отличаются от контроля (см. табл. 1), что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза.

Обсуждая полученные результаты, важно отметить, что в условиях 24-часовой иммобилиза-

ции нами не выявлено повышения числа клеток, находящихся в состоянии раннего апоптоза. Напротив, через 24 ч от начала стрессорного воздействия отмечается статистически значимое повышение числа тимоцитов с поврежденными мембранами, через которые легко проникает 7-ADD. Введение антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов самцам мышей за 30 мин от начала иммобилизации частично отменяет выявленные изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов при стрессе в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза. Возможно, что увеличение числа тимоцитов, экспрессирующих фосфатидилсерин, при иммобилизационном стрессе развивается в более ранние сроки, что требует дополнительных исследований. Подтверждением этому является недавно опубликованная работа [7], в

которой для выявления раннего апоптоза тимоцитов через 3 ч после введения гидрокортизона использовали метиловый эфир тетраметилпродамина.

Заключение

Таким образом, острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит

к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)). Введение мифепристона нивелирует эти изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза.

Список литературы / References

1. Старская И.С., Полевщиков А.В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология, 2013. Т. 34, № 5. С. 271-277. [Starskaya I.S., Polevshchikov A.V. Morphological aspects of atrophy of the thymus under stress. *Immunology = Immunologiya*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 271-277. (In Russ.)]
2. Alexander J.K., DeVries A.C., Kigerl K.A., Dahlman J.M., Popovich P.G. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain Behav. Immun.*, 2009, Vol. 23, no. 6, pp. 851-860.
3. Claman H.N., Moorhead J.W., Benner W.H. Corticosteroids and lymphoid cells in vitro. I. Hydrocortisone lysis of human, guinea pig, and mouse thymus cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 1971, Vol. 78, no. 4, pp. 499-507.
4. Muscari I., Adorisio S., Liberati A.M., Thuy T.T., Van Sung T., Cannarile L., Ayroldi E., Riccardi C., Delfino D.V. Bcl-xL overexpression decreases GILZ levels and inhibits glucocorticoid-induced activation of caspase-8 and caspase-3 in mouse thymocytes. *J. Transl. Autoimmun.*, 2020, Vol. 3, 100035. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100035.
5. Paré W.P., Glavin G.B. Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1986, Vol. 10, no. 3, pp. 339-370.
6. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1936, Vol. 17, no. 3, pp. 234-248.
7. Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Balcan E., Polevshchikov A.V. The experience in lectins application to assess changes in the carbohydrate composition of murine thymocytes glycocalyx in the early and late apoptotic stages. *Cell Tissue Biol.*, 2020, Vol. 14, no. 6, pp. 427-436.

Авторы:

Шилов Ю.И. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Шилов С.Ю. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Shilov Yu.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Immunology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Shilov S. Yu., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Normal Physiology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Барков С.Ю. — очный аспирант лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

Шилова Н.А. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Barkov S. Yu., Postgraduate Student, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shilova N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 29.05.2022