

На правах рукописи

**АГЕЕВА**  
**Елизавета Сергеевна**

**МЕХАНИЗМЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ  
ЛИМФОЦИТОВ, ЭОЗИНОФИЛОВ И НЕЙТРОФИЛОВ  
У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

14.00.16 – патологическая физиология

Автореферат  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

Иванчук  
Игорь Иванович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Степовая  
Елена Алексеевна

доктор медицинских наук,  
профессор

Маслов  
Леонид Николаевич

**Ведущая организация:**

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Суханова Г.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Бронхиальная астма представляет собой одну из наиболее актуальных медицинских проблем. Это обусловлено, в первую очередь, широкой распространенностью заболевания. Эпидемиологические исследования последних лет свидетельствуют о том, что в разных странах от 4 до 10% населения планеты страдают бронхиальной астмой различной степени выраженности [Огородова Л.М., 2004; GINA, 2004]. В детской популяции этот показатель достигает 10–15% и является самым частым хроническим заболеванием у детей [Гудина М.В., 2004; Лютина Е.И., 2005]. Отмечается устойчивая тенденция к усилению тяжести течения и формированию резистентных форм бронхиальной астмы [Огородова Л.М., 1999; Чучалин А.Г., 2005].

Течение астмы сопровождается прогрессирующим воспалением, ключевой характеристикой которого является обратимая обструкция и неспецифическая гиперреактивность дыхательных путей [Новиков В.С., 1996; Lambrecht B.N., 2003]. Не вызывает сомнения, что ведущая роль в патогенезе заболевания принадлежит хроническому воспалению, в основе которого лежит персистенция лейкоцитов в тканях бронхов [Jang A.S., 2000; Humbles A.A., 2004]. Наличие в органах-мишенях длительно существующих клеток регуляторного и эффекторного звеньев может быть обусловлено не только их повышенной миграцией в ткани, но и замедлением элиминации клеток вследствие нарушений процессов программируемой клеточной гибели [Jayaraman S., 1999; Vignola A.M., 1999; Минеев В.Н., 2003].

Апоптоз обеспечивает сохранение мембранной целостности клеток, снижение их цитотоксической и секреторной активности с последующим фагоцитозом целых клеток или апоптотических телец без высвобождения медиаторов [Chilvers E.R., 1998; Afford S., 2000]. В свою очередь снижение апоптоза приводит к увеличению некроза клеток в очаге воспаления. Некротическая гибель сопровождается выделением провоспалительных медиаторов, обладающих цитотоксическим и гистохимическим действием; увеличением пролиферации и миграции в очаг воспаления новых клеток–эффекторов [Невзорова В.А., 2001; Черняк А.В., 2001; Dahl R., 2001; Dziedziczko A., 2004]. Таким образом, апоптоз играет ключевую роль в ограничении повреждения ткани, а воспалительный процесс является результатом дефекта этих механизмов [Haslett C., 1999; Трофимов В.И., 2001].

Апоптоз является одним из важных ген-регулируемых процессов и тесно связан с рядом тех сигнал-проводящих систем, изменение которых имеет большое патогенетическое значение и для бронхиальной астмы [Cohen J.J., 1993; Минеев В.Н., 2003]. Механизмы программируемой клеточной гибели, которые развиваются в норме и при бронхиальной астме, на современном этапе не являются до конца изученными, а литературные данные по этому вопросу весьма противоречивы [Бойчук С.В., 2001; Мамонтова Т.В., 2005; Gottlieb R.A., 2000; Cregan S.P., 2004]. Кроме того, апоптоз не является единст-

венным проявлением программируемой клеточной гибели. Известно, что гибель клеток может протекать без участия каскада каспаз. Существует ряд альтернативных (каспаза-независимых) форм программируемой гибели клеток, одной из которых является параптоз [Sperandio S., 2000; Wang Y., 2004]. В клетках запускается сразу несколько путей гибели и в процессе развития они могут переключаться [Leist M., 2001].

Индукция программируемой гибели иммунных клеток - механизм, успешно применяемый организмом для купирования нарушений в иммунной системе [Murphy F.J., 2003]. Апоптоз эффекторных клеток может ограничить ответ при хроническом воспалении [Chilvers E.R., 1998; Haslett C., 1999; Simon H.U., 2003]. Таким образом, изучение и расшифровка механизмов апоптоза является одним из наиболее актуальных направлений современной медицинской науки. Выявление конкретных механизмов регуляции апоптоза, сопровождаемых заболеванием, позволит определить стратегию терапевтического вмешательства. Возможность целенаправленной индукции или ингибирования апоптоза может быть эффективным путем лечения некоторых патологических состояний. В связи с этим развитие исследований в этом направлении необходимо считать высокоприоритетными.

Необходимо отметить, что в работах, посвященных изучению нарушений механизмов апоптоза при бронхиальной астме, в большей степени рассматривается роль лимфоцитов и эозинофилов [Corrigan C.J. 1992; Ohashi Y., 1992; Jang A.S., 2000; Бойчук С.В., 2003]. Гораздо менее изученным является изменение апоптоза нейтрофилов, чья роль в патогенезе астмы так же достаточно велика [Sanghavi D.M., 1998; Haslett C., 1999; Минеев В.Н., 2003; Маянский Н.А., 2004]. Таким образом, все вышеизложенное определяет актуальность, перспективность и практическую значимость научного поиска в области механизмов программируемой клеточной гибели, как возможного патогенетического фактора при бронхиальной астме.

**Цель исследования:** Определить роль и изучить механизмы программируемой гибели лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов у больных бронхиальной астмой.

**Задачи исследования:**

1. Оценить уровень гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови (лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов) у больных бронхиальной астмой в зависимости от клинических особенностей и активности воспаления.
2. Выявить особенности экспрессии мРНК проапоптотических и антиапоптотических эффекторов в зависимости от тяжести астмы; и возможные пути их взаимодействия в процессе программируемой гибели лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов больных бронхиальной астмой.
3. Установить значение транскрипционных факторов в регуляции экспрессии про- и антиапоптотических эффекторов методом исследования экспрессии генов (NF-kB, p53) и их ДНК-связывающей способности.

4. Оценить действие индукторов апоптоза *in vitro* (специфического - дексаметазон и неспецифического - перекись водорода) на гибель иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой.

5. Выявить особенности механизмов реализации программируемой гибели при бронхиальной астме в зависимости от типа иммунокомпетентных клеток (эозинофилы, нейтрофилы, лимфоциты).

**Научная новизна.** Впервые с привлечением современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования проведено комплексное изучение про- и антиапоптотических систем в эозинофилах, нейтрофилах и лимфоцитах больных бронхиальной астмой с учетом тяжести заболевания. Установлено, что при бронхиальной астме угнетение механизмов программируемой гибели лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов реализуется через увеличение экспрессии мРНК антиапоптотических факторов (Bcl-2, Bfl<sub>1</sub>, Bcl-x<sub>L</sub>, cIAP<sub>1</sub>, cIAP<sub>2</sub>). Степень нарушения механизмов программируемой клеточной гибели ассоциирована с тяжестью заболевания и активностью воспаления бронхиальной астмы. Получены данные, свидетельствующие об увеличении экспрессии мРНК и ДНК-связывающей способности нуклеарного фактора NF-κB. Выявлено, что у больных бронхиальной астмой снижена экспрессия гена p53. ДНК-связывающая способность транскрипционного фактора p53 также снижена и коррелирует с тяжестью бронхиальной астмы. Показано, что специфический индуктор апоптоза - дексаметазон *in vitro* приводит к увеличению уровня апоптоза и снижению некроза иммунокомпетентных клеток периферической крови больных бронхиальной астмой. Использование неспецифического индуктора - перекиси водорода приводит к увеличению уровня апоптотической гибели лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов.

**Теоретическое и практическое значение работы.** В результате исследования получены новые данные, касающиеся ключевых механизмов нарушения регуляции программируемой гибели иммунокомпетентных клеток при бронхиальной астме. Исследование с применением индукторов апоптоза позволило выявить особенности программируемой гибели в зависимости от типа клеток. Полученные данные могут послужить основой для создания новых высокоэффективных методов молекулярной терапии, прогнозирования эффективности лечения сложно-контролируемых и терапевтически-резистентных форм бронхиальной астмы.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Бронхиальная астма сопровождается нарушением реализации механизма программируемой гибели, что проявляется снижением уровня апоптоза и увеличением некроза иммунокомпетентных клеток периферической крови (лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов). Нарушения программируемой гибели носят однонаправленный характер для всех иммунокомпетентных клеток периферической крови.

2. Дефект программируемой гибели при бронхиальной астме является результатом дисбаланса между эффекторами апоптоза (увеличением экспрессии мРНК антагонистов и снижением агонистов). Нарушения программируемой гибели иммунокомпетентных клеток ассоциированы с изменением экспрессии и функциональной активности транскрипционного фактора p53.

3. Индукторы апоптоза *in vitro* воздействуют на различные пути реализации механизмов программируемой гибели, увеличивая апоптотическую гибель клеток. Вид клеточной гибели, который активируется при действии индукторов, зависит от типа клеток.

**Апробация работы.** Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на Всероссийской Пироговской студенческой научной конференции (Москва, 2003), на Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2003, 2004), на Европейском респираторном конгрессе (Вена, 2003, Глазго, 2004), на 13 конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2005), на Всероссийской конференции «Фундаментальные науки - медицине» (Новосибирск, 2005).

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета. Методы РТ-ПЦР апоптотических факторов и метод оценки ДНК-связывающей способности транскрипционных факторов адаптированы и внедрены в практику научных исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 журнальных статей, из которых 2 - в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 162 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов, главы собственных исследований, главы обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 41 рисунок и 17 таблиц. Список источников литературы включает в себя 204 работы, из которых 52 отечественных и 152 - зарубежных авторов.

Работа выполнена на базе отдела биохимии (зав. отд. - д.м.н. А.Э. Сазонов) и отдела молекулярной биологии (зав. отд. - д.м.н. И.И. Иванчук) Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (зав. ЦНИЛ – д.м.н., профессор А.Н. Байков), кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета Сибирского государственного медицинского университета (зав. каф. - д.м.н., профессор Л.М. Огородова), кабинета функциональной диагностики областного детского центра клинической иммунологии-аллергологии Областной детской больницы, г. Томск (зав. каб. - к.м.н. И.А. Деев), Астма-центра Областной клинической больницы, г. Томск (гл. врач – к.м.н. Б.Т Серых).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 146 человек в возрасте от 14 до 65 лет: 30 здоровых и 116 больных БА с легкой (n=20), среднетяжелой (n=20) и тяжелой (n=76) формой заболевания.

Группы больных составили амбулаторные и стационарные пациенты, имеющие положительные результаты кожных аллергопроб и ранее подтвержденный диагноз бронхиальной астмы [GINA, 2004]. На момент включения в исследование в каждую из групп необходимо было наличие у них одного или более признаков представленных в таблице 1.

**Таблица 1**

Критерии включения в исследование пациентов с бронхиальной астмой

Группы пациентов	Дневные симптомы	Ночные симптомы	ПСВ (ОФВ <sub>1</sub> ), % от должного
Легкая бронхиальная астма	чаще 1 раза в неделю	чаще 2 раз в месяц	≥ 80
Среднетяжелая бронхиальная астма	ежедневные	чаще 1 раза в неделю	60 - 80, <sup>1</sup>
Тяжелая бронхиальная астма	ежедневные	частые	≤ 60, <sup>2</sup>

*Примечание:* 1-ежедневное использование короткодействующих β<sub>2</sub>-агонистов; 2-ограничение физической активности.

Критериями для включения в контрольную группу являлось наличие у них отрицательных аллергопроб; IgE < 100 МЕ/мл; отсутствие аллергических заболеваний на момент включения и в анамнезе, а также отсутствие острых респираторных заболеваний на момент включения.

Все пациенты, включая контрольную группу, не должны были получать в течение последнего месяца глюкокортикостероиды (системные, топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β<sub>2</sub> – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб.

Во всех группах была проведена оценка функциональных тестов ОФВ<sub>1</sub> (спирометрия), ПСВ (пикфлоуметрия) ПК<sub>20</sub> (метахолиновая проба) с использованием спирографа MasterScope (Erich Jaeger GmbH, Германия).

Определение абсолютного и относительного содержания клеток в периферической крови (ПК) проводили общепринятыми методами [Новицкий В.В., 1999]. Оценку жизнеспособности клеток проводили с 1% раствором трипанового синего в камере Горяева [Nicoletti I., 1991].

Неспецифический IgE в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью стандартного набора реагентов «Вектор БЕСТ IgE – ИФА – БЕСТ – стрип». Определение свободного ИЛ-5 в сыворотке крови проводили методом ИФА «СУТЕЛИСА-IL-5» согласно приложенной инструкции.

Для качественной оценки гибели клеток ПК использовали электрофорез фрагментов ДНК, выделенных методом Мармура [Marmur J., 1961]. Критерием апоптотической гибели клеток считалась «лесенка» из фрагментов ДНК различной длины.

Для количественного анализа гибели клеток из культуральной суспензии готовили препараты по общепринятой методике [Меньшиков В.В., 1997]. Для световой микроскопии мазки окрашивали по Нохта-Максимову (азур II-эозин). Для люминесцентной микроскопии клеточный материал окрашивали водным раствором акридинового оранжевого и бромистого этидия. Использовали стандартные показатели морфологии ядра клеток [Rigler R.J., 1966]. Подсчитывали не менее 200 клеток на экспериментальную точку. Для трансмиссионной электронной микроскопии клеточный материал готовили стандартным методом [Карупу В.Я., 1984]. Срезы окрашивали 2% раствором уранилацетата в 50% этаноле и цитратом свинца [Reynolds E.S., 1963]. При анализе использовали карио- и цитопатологические изменения в клетках [Allen R.T., 1997; Sperandio S., 2000].

Электронно-микроскопическое исследование было выполнено в лаборатории электронной микроскопии ФГУП «НПО «Микроген» Росздрави РФ «НПО «Вирион», г. Томск (начальник лаборатории Миллер А.А.).

Обогащенную суспензию ядродержащих клеток ПК инкубировали при 37°C в течение 24 часов в культуральной среде. Для индукции апоптоза использовали дексаметазон (1 мМоль) и перекись водорода (0,01%). Для установления взаимосвязи спонтанного и индуцированного апоптоза клеток определяли относительный апоптотический.

Анализ экспрессии мРНК AIF, Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x<sub>L/S</sub>, Bfl1, cIAP<sub>1,2</sub>, ИЛ-5, NF-κB, p53 проводили со специфическими праймерами («Биосет», Новосибирск). Тотальную РНК выделяли набором «QIAGEN RNA/DNA» (Германия) согласно приложенной инструкции. Показатели экспрессии выражали в % относительно экспрессии мРНК ГАФДГ (глицеральдегид 3-фосфат дегидрагеназы), которая принималась за 100 %.

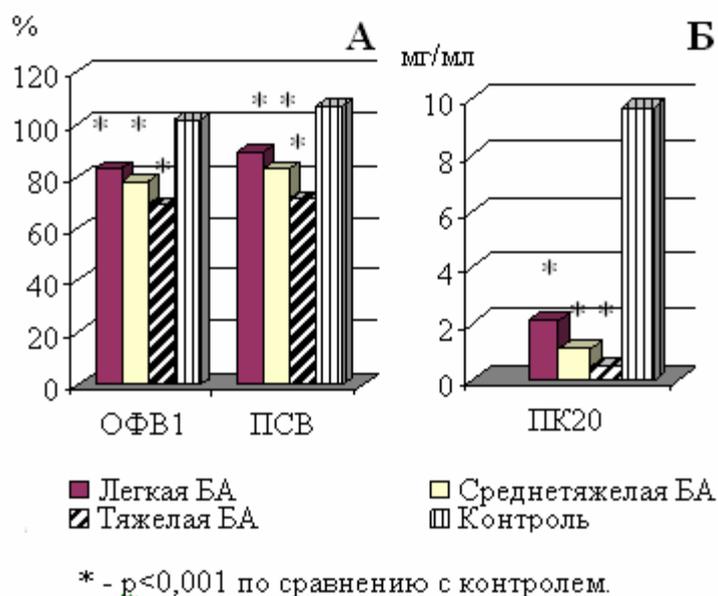
Экстракцию белка для оценки ДНК-связывающей способности транскрипционных факторов p53 и NF-κB проводили модифицированным методом [Bohrer H., 1997]. Для количественной оценки использовали ДНК-связывающую способность транскрипционного фактора ОСТ-1 (эталонная проба), результат которой принимали за 100%.

Электрофореграммы обрабатывали при помощи компьютерной программы «Biotest D».

Статистический анализ производился с помощью пакета программ «Statistica for Windows 6.0» и компьютерной программы MegaStat для Microsoft Excel с использованием непараметрических W- и T-критериев Вилкоксона. Для корреляционного анализа использовали критерий Спирмена. Для выявления наиболее значимого фактора был проведен факторный анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате клинических и параклинических исследований нами было установлено, что у больных БА нарушена функция внешнего дыхания (рис. 1). Выявленное снижение уровня ОФВ<sub>1</sub>, ПСВ и ПК<sub>20</sub> у больных по сравнению с контролем свидетельствует об обструкции и высоком уровне гиперреактивности бронхов. Из данных литературы известно, что гиперреактивность и, как следствие, обструкция бронхов развиваются в результате комплексного взаимодействия воспалительных клеток, медиаторов и клеток и тканей дыхательных путей [Невзорова В.А., 2001]. В первую очередь это эозинофилы, высвобождаемые ими медиаторы, приводят к бронхоконстрикции, повышению проницаемости сосудов, активации других клеток-эффекторов, высвобождению гистамина и развитию гиперреактивности [Gerald J., 2000]. Инфильтрация стенки бронхов эозинофилами и повреждение эпителия дыхательных путей является характерной чертой бронхиальной астмы [Kieilman B., 1994; Gleich G.J., 1996]. В исследовании было выявлено увеличение эозинофилов периферической крови (ПК) у больных (легкая БА - 7,1±0,67%, среднетяжелая - 6,8±0,64% и тяжелая - 9,1±0,42%) по сравнению с контрольной группой (2,2±0,32%). Полученные результаты подтверждают эозинофильный характер воспаления.

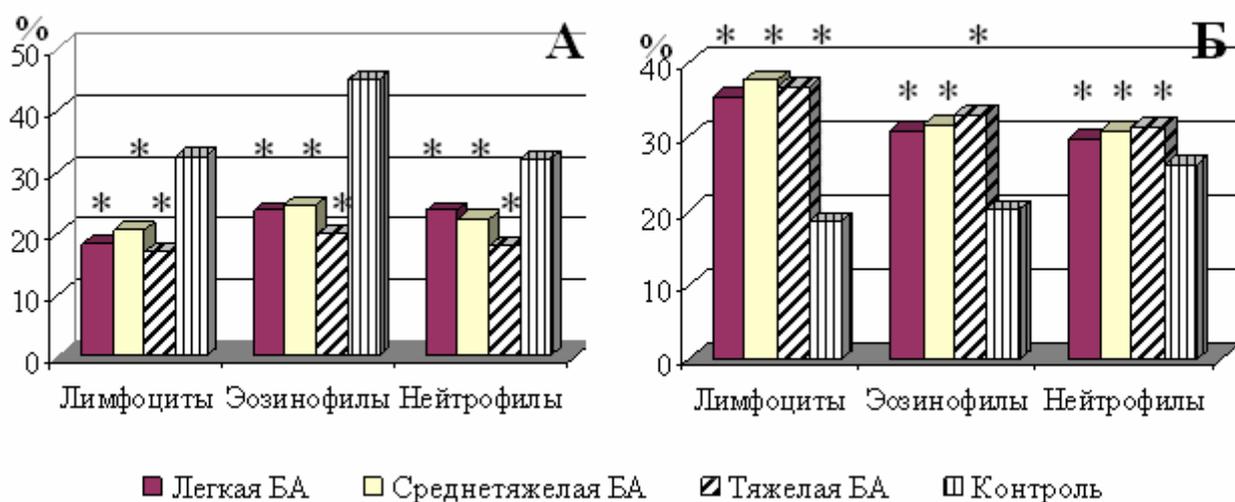


**Рис. 1.** Показатели функции внешнего дыхания у больных бронхиальной астмой

Очевидно, что уровень эозинофилии зависит от уровня ИЛ-5, оказывающего влияние на миграцию, активацию, эффекторную функцию и апоптотическую активность эозинофилов. В работе было установлено, что уровень экспрессии мРНК ИЛ-5 у больных БА был повышен. Известно, что при БА имеет место преимущественная активация Th2 типа, приводящая к развитию IgE-зависимых реакций. Формируется характерный для Th2-пути цитокиновый профиль (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6). Таким образом, основными продуцентами ИЛ-5 являются лимфоциты, а ведущая роль в формировании бронхиального воспаления принадлежит IgE - опосредованному механизму. Нами было выявлено, что у больных БА уровень IgE значительно повышен (легкая БА - 296,05±39,1 МЕ/мл; среднетяжелая - 216,79±30,8 МЕ/мл; тяжелая - 282,64±18,6 МЕ/мл) по сравнению с контролем (47,63±2,79 МЕ/мл). Повышенное содержание IgE у больных говорит о реализации атопического механизма развития БА. Факторный анализ подтвердил, что IgE, в первую очередь, отра-

жает патогенетический механизм заболевания в представленной выборке пациентов.

Известно, что хроническое течение БА обусловлено не только повышенной миграцией клеток-эффекторов в очаг воспаления, но и замедлением их элиминации [Jayaraman S., 1999; Vignola A.M., 1999]. В ходе исследования было выявлено, что у больных БА происходит задержка апоптоза лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов ПК, по сравнению с уровнем апоптоза клеток у здоровых доноров. В группе больных тяжелой БА наблюдалась наибольшая степень снижения апоптоза. Некроз иммунокомпетентных клеток у всех больных БА был, наоборот, увеличен по сравнению с контролем (рис. 2).



\* -  $p < 0,001$  достоверность различий при сравнении показателей с контролем.

**Рис. 2.** Показатели спонтанного апоптоза (А) и некроза (Б) иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой

Нами был проведен факторный анализ уровня апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток ПК (лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов) и основных показателей, характеризующих тяжесть БА (ОФВ<sub>1</sub>, ПСВ, ПК<sub>20</sub>, IgE, содержание эозинофилов ПК) (табл. 2).

**Таблица 2**

Факторный анализ показателей функциональных и лабораторных тестов у больных бронхиальной астмой

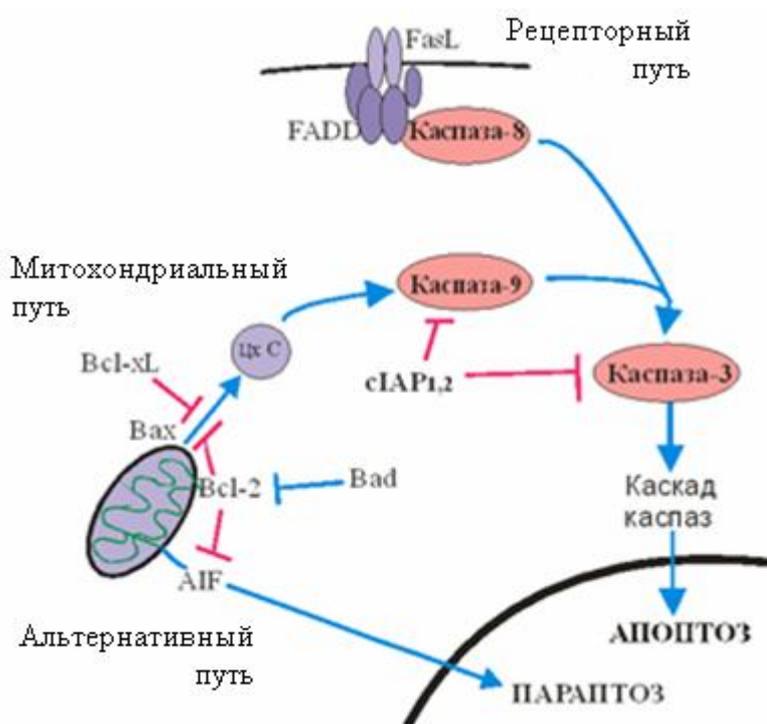
Показатели	Фактор 1		Фактор 2	
	Показатель	Факторная нагрузка	Показатель	Факторная нагрузка
Некроз нейтрофилов		-0,81	ОФВ <sub>1</sub>	0,74
Апоптоз эозинофилов		-0,85		
Некроз эозинофилов		-0,76		

Полученные результаты показали, что первый фактор формирует нарушение процессов программируемой клеточной гибели в клетках (уровень апопто-

за и некроза), вторым фактором является ОФВ<sub>1</sub> - ведущий симптоматический признак БА (табл. 2).

Безусловно, выделение медиаторов в результате некротической гибели клеток представляет собой основную причину обструкции и гиперреактивности бронхов при БА. Наиболее важная роль в этом принадлежит дефекту апоптоза эозинофилов и нейтрофилов ПК.

Регуляция процессов ПКГ, в основном, зависит от соотношения про- (Bax, Bcl-x<sub>S</sub>, Bad, AIF) и антиапоптотических (Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bfl<sub>1</sub>, cIAP<sub>1</sub> и cIAP<sub>2</sub>) факторов (рис. 3). Нами было выявлено, что при БА доминируют антагонисты апоптоза. Уровень экспрессии мРНК Bcl-2 у больных БА составил 10,9±0,16% против 0,40±0,09% в контроле; Bfl<sub>1</sub> - 16,2±0,48%, в контроле - 3,40±0,18%. Существенное значение для подавления процессов ПКГ имеют ингибиторы



**Рис. 3.** Роль апоптотических факторов в развитии программируемой гибели клетки

ры каспаз - cIAP<sub>1</sub> и cIAP<sub>2</sub>. Результаты исследования показали увеличение мРНК cIAP<sub>1</sub> и cIAP<sub>2</sub> у больных БА (51,6±0,59% и 31,7±1,23%) по сравнению с контролем (31,8±0,98% и 11,3±0,29% соответственно).

Таким образом, активная экспрессия антиапоптотических эффекторов Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bfl<sub>1</sub> существенно снижает вероятность реализации митохондриального пути апоптоза, а высокий уровень мРНК cIAP<sub>1</sub> и cIAP<sub>2</sub> блокирует и рецепторный механизм ПКГ при БА. Возможно, что у больных БА ПКГ реализуется, главным образом, через активацию AIF - альтернативного механизма клеточной гибели. Уровень экспрессии мРНК AIF у больных БА составил 0,67±0,05%, в контрольной группе - 0,4±0,09%.

Известно, что экспрессия апоптотических эффекторов зависит от активности транскрипционных факторов (p53, NF-kB). В ходе работы нами установлено, что у больных БА экспрессия мРНК p53 составила 2,35±0,12%, ДНК-связывающая способность - 19,31±0,24%. В группе контроля 4,22±0,21% и 38,9±3,97% соответственно.

Возможно, что уменьшение экспрессии генов белком p53 зависит от продукции Th2-лимфоцитами цитокинов. Снижение функции p53 может быть связано с генетическим дефектом этого белка. Кроме того, существуют му-

тантные формы p53, которые приобретают новые свойства, не характерные для белка p53 дикого типа [Ярилин А.А., 1996; Wang X.L., 2004]. В результате понижения активности p53 экспрессия эффекторов апоптоза изменяется в сторону увеличения антиапоптотических факторов, что было подтверждено корреляционной зависимостью между уровнем мРНК p53 и экспрессией мРНК Bcl-x<sub>L</sub> (r=0,51), cIAP<sub>1</sub> (r=0,84), Bcl-x<sub>S</sub> (r=0,59), AIF (r=0,80), и Bad (r=0,81) при p<0,001.

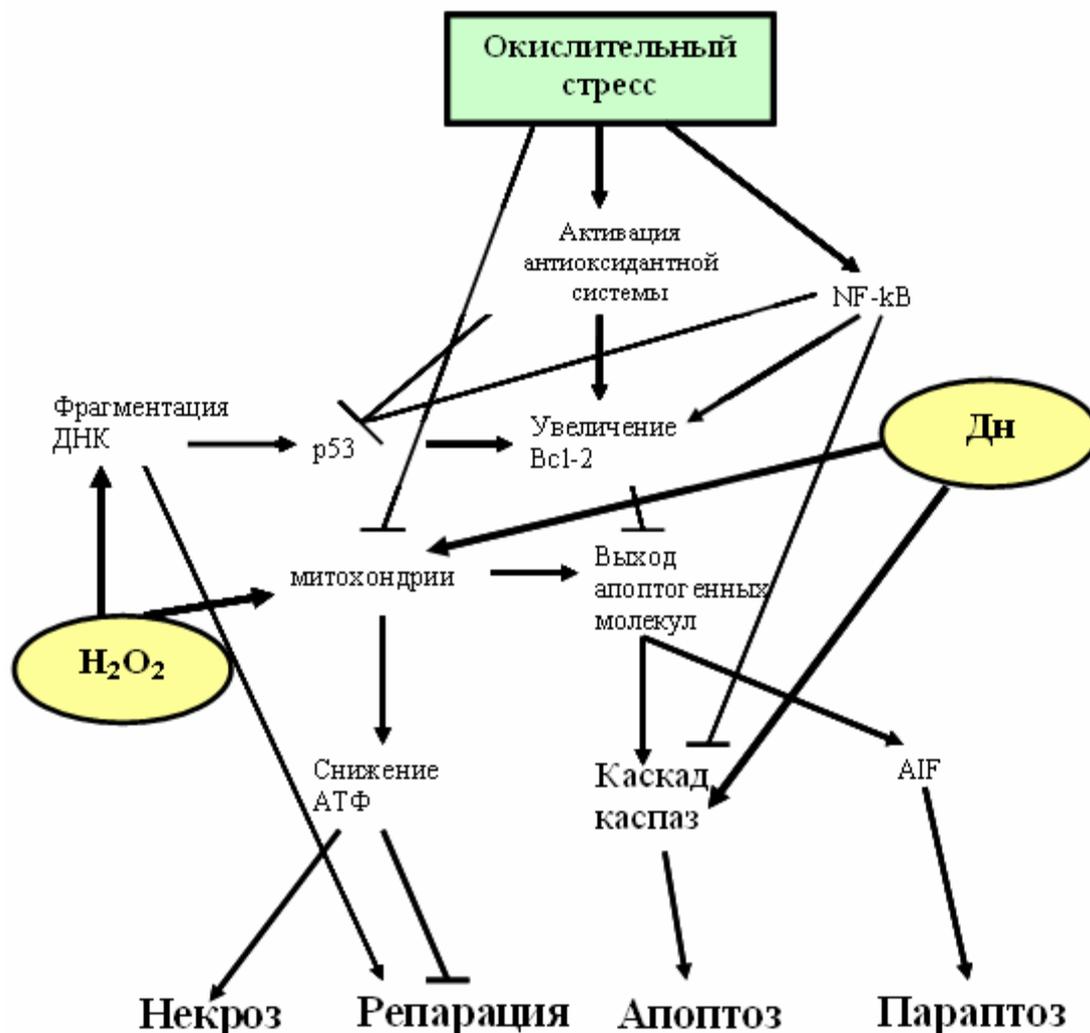
Экспрессия мРНК NF-kB (25,14±0,36%) и ДНК-связывающая способность NF-kB (31,78±0,43%) у больных БА была выше по сравнению с контролем (18,29±1,40% и 21,0±3,12%, соответственно). Одной из мишеней транскрипционной активности NF-kB является ген ИЛ-5 [Christman J.W., 2000], что объясняет выявленную нами положительную корреляцию между содержанием эозинофилов ПК и уровнем мРНК NF-kB у больных БА. Исследование показало отрицательную зависимость между экспрессией мРНК NF-kB и ОФВ<sub>1</sub> (r= -0,50, p<0,001), то есть увеличение уровня NF-kB связано с нарушением функции внешнего дыхания. Несомненно, что снижение апоптоза иммунокомпетентных клеток и развитие гиперреактивности при БА связано с изменением активности транскрипционных факторов.

Все исследуемые эффекторы апоптоза у больных БА коррелировали с тяжестью заболевания. В группе больных тяжелой БА нарушения были выражены в большей степени по сравнению с показателями в группах больных легкой и среднетяжелой БА, различия между которыми, не всегда носили достоверный характер. У больных тяжелой БА определялись более выраженные изменения ФВД и апоптоза иммунокомпетентных клеток ПК по сравнению с группами больных легкой и среднетяжелой БА. Факторный анализ подтвердил, что основными показателями характеризующими тяжесть заболевания является ОФВ<sub>1</sub> и уровень IgE.

Апоптоз - высоко регулируемый процесс, модулируемый многочисленными экстра- и интрацеллюлярными механизмами, которые могут быть использованы для селективной индукции апоптоза клеток-эффекторов воспаления [Минеев В.Н., 2003]. Выявленная взаимосвязь между уровнем апоптоза эозинофилов и нейтрофилов (r=0,32, p<0,01) и между уровнем апоптоза эозинофилов и лимфоцитов (r=0,47, p<0,001) указывает на тесную взаимосвязь между пулами этих клеток, и, вероятно, общий механизм активации ПКГ, а следовательно, на сходные пути регуляции апоптоза. Взаимосвязь между апоптозом и некрозом клеток (лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов) больных БА (r=0,74, p<0,001) говорит о том, что сигнал, активирующий механизмы ПКГ, не является специфическим для какого-то конкретного типа клеточной гибели. Для выявления возможных механизмов регуляции в исследовании были использованы индукторы апоптоза (дексаметазон и перекись водорода).

Дексаметазон *in vitro* взаимодействует с белками митохондрий, что приводит к открытию пор, активирует каспазу-3, подавляет ингибирующее дейст-

вие сIAP<sub>1</sub> и сIAP<sub>2</sub> на каспазы, способствует выбросу AIF [Letuve S., 2001]. Таким образом, дексаметазон реактивирует митохондриальный и рецепторный пути апоптоза и запускает альтернативный механизм ПКГ (рис. 4).

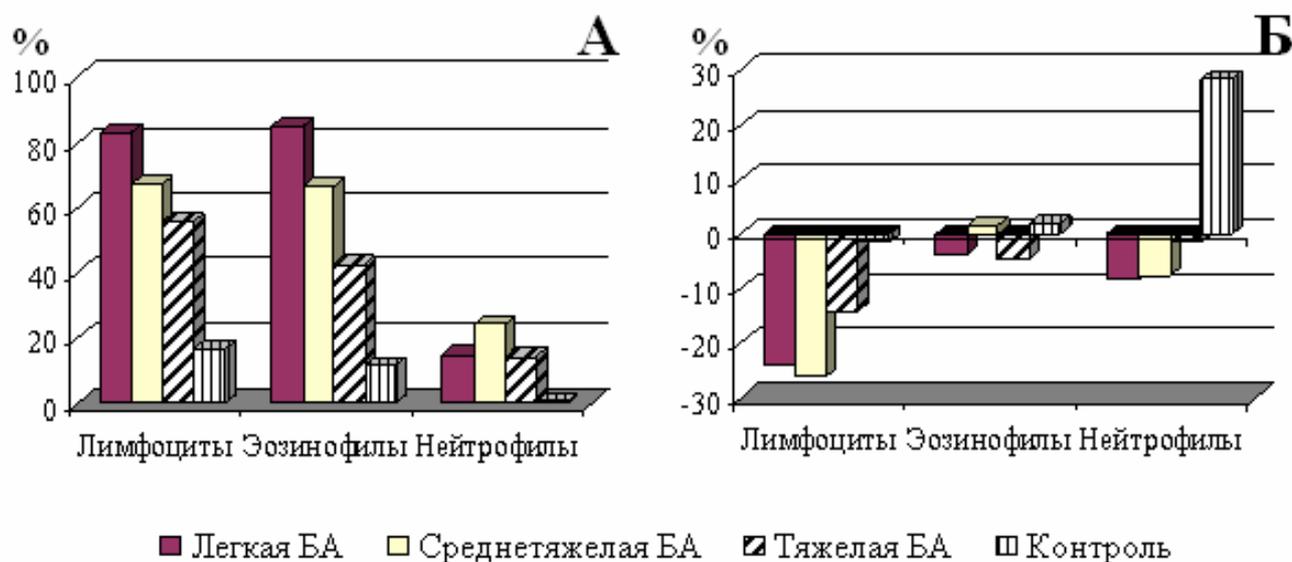


**Рис. 4.** Схема, показывающая звенья апоптоза, на которые воздействуют индукторы программируемой клеточной гибели. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода, Дн – дексаметазон

Изучение влияния перекиси водорода на гибель клеток периферической крови обусловлено существующим мнением о том, что окислительный стресс способствует поддержанию хронического воспаления при БА [Подколзин А.А., 2000]. В бронхах формируется лейкоцитарный инфильтрат, состоящий из клеток, которые реализуют свой потенциал путем продукции ими активных форм кислорода [Маянский А.Н., 1983; Меньщикова Е.Б., 1991]. В результате повреждающего действия радикалов клетки, которые не способны предотвратить накопление активных продуктов кислорода, элиминируются апоптозом. В связи с этим увеличение выживаемости клеток можно рассматривать, как регуляторный механизм, направленный на подавление генерации активных ки-

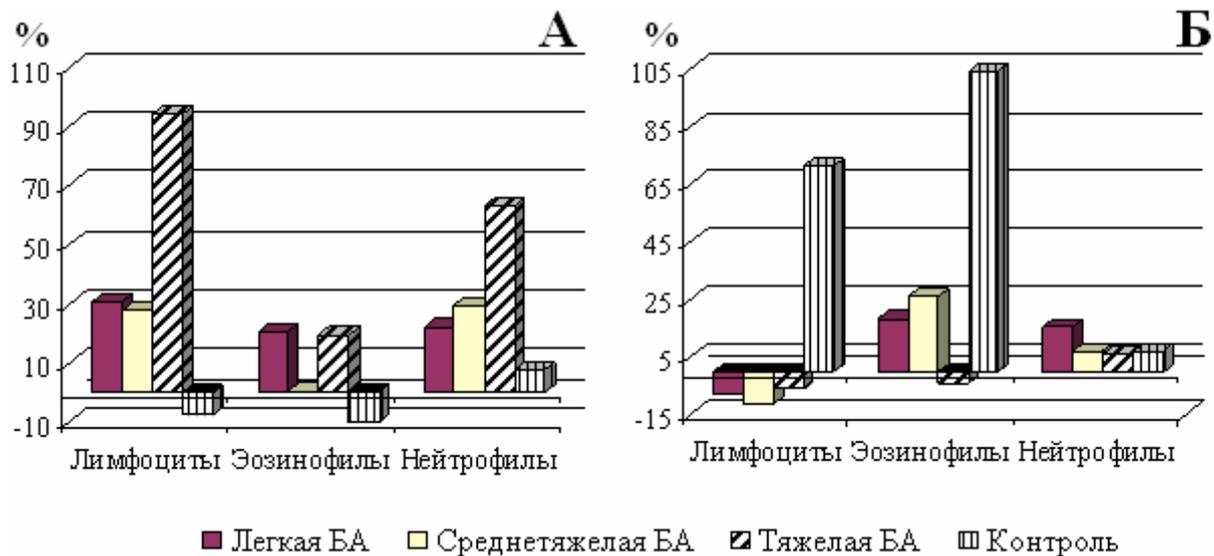
слородных метаболитов (АКМ) и одновременного снижения риска развития ПКГ. Известно, что многие ингибиторы апоптоза обладают антиоксидантной активностью [Ying S., 1995]. Данное предположение объясняет механизм увеличения выживаемости и снижения апоптоза иммунокомпетентных клеток при БА. Выявленное нами увеличение экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и снижение уровня p53 у больных можно рассматривать, как дополнительный фактор в системе антиоксидантной защиты организма на клеточном уровне в условиях окислительного стресса при БА.

Таким образом, при изучении действия индукторов апоптоза *in vitro* нами было установлено, что дексаметазон приводит к увеличению гибели клеток. Интенсивность индуцированного апоптоза зависела от типа клеток: в лимфоцитах и эозинофилах ПК больных БА интенсивность апоптоза была выше по сравнению с интенсивностью апоптоза нейтрофилов. Интенсивность некроза у больных БА была снижена (рис. 5).



**Рис. 5.** Относительный индекс апоптотической (А) и некротической (Б) гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови больных бронхиальной астмой после индукции дексаметазоном

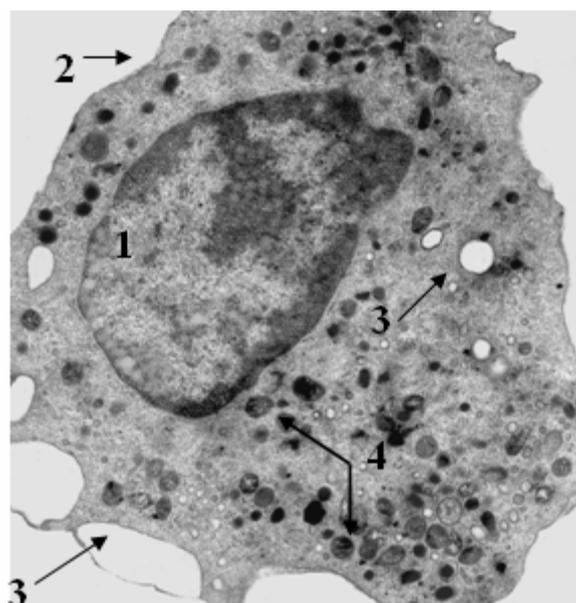
Перекись водорода *in vitro* так же привела к увеличению гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови больных БА по сравнению с интактной культурой (рис. 6). При этом интенсивность апоптоза и некроза, индуцированных перекисью водорода, не зависела от типа клеток или тяжести БА.



**Рис.6.** Относительный индекс апоптотической (А) и некротической (Б) гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови больных бронхиальной астмой после индукции перекисью водорода

В результате анализа полученных данных видно, что интенсивность апоптоза эозинофилов, индуцированного дексаметазоном, значительно превышала аналогичное влияние перекиси водорода на апоптоз эозинофилов. В связи с этим можно сказать, что в эозинофилах основная роль в реализации ПКГ принадлежит апоптозу (реактивация рецепторного и митохондриального пути).

Высокий относительный апоптотический индекс лимфоцитов после индукции дексаметазоном и перекисью водорода свидетельствует о том, что в лимфоцитах больных БА реализация ПКГ происходит и по апоптотическому, и по парапторическому (альтернативному) механизмам. Выявленная нами корреляция между индуцированным апоптозом лимфоцитов ПК больных БА и мРНК AIF ( $r=0,33$ ,  $p<0,001$ ) подтверждает предположение о значительной роли альтернативного механизма ПКГ в лимфоцитах при БА. Наличие парапторической гибели клеток у больных БА было подтверждено нами цитологически (рис. 7).



**Рис. 7.** Лимфоцит с признаками параптоза (1-отсутствие фрагментации ядра, 2-целостность плазматической мембраны, 3-вакуолизация цитоплазмы, 4-набухание митохондрий). Трансмиссионная электронная микроскопия,  $\times 27000$

В нейтрофилах больных БА дексаметазон приводил к увеличению апоптоза и снижению некроза. В группах больных БА действие перекиси водорода

вызывало увеличение интенсивности как апоптоза, так и некроза нейтрофилов (рис. 6). Интенсивность апоптоза, индуцированного перекисью водорода, была выше по сравнению с влиянием дексметазона на апоптоз нейтрофилов.

Возможное объяснение этому заключается в повышенной “готовности” нейтрофилов к гибели. Прежде всего, это связано с основной функцией нейтрофилов – поддержанием цитокинового профиля на определенном уровне, что опосредованно достигается при гибели клеток в очаге воспаления. В связи с этим, нейтрофилы являются более восприимчивыми по сравнению с другими клетками к сигналам клеточной гибели [Маянский Н.А., 2004]. Исходя из того, что дексаметазон и перекись водорода способны активировать альтернативный путь клеточной гибели, то, возможно, что в нейтрофилах приоритетным является каспаза-независимый механизм реализации ПКГ.

В литературе имеются сведения о том, что глюкокортикоиды на апоптоз нейтрофилов оказывают обратный эффект по сравнению с индукцией апоптоза в лимфоцитах и эозинофилах [Минеев В.Н., 2003; Meagher L.C., 1996]. Действительно, подобные результаты были получены нами в нейтрофилах контрольной группы. Кроме того, в эозинофилах и лимфоцитах контрольной группы данные изучения влияния индукторов на ПКГ диаметрально отличались от полученных результатов клеточной гибели в клетках больных БА. Возможно, это связано с тем, что в группе контроля на момент действия индукторов все системы находились в неактивном состоянии и проапоптотические эффекторы не успели наработаться. Кроме того, окислительный стресс у больных БА наряду с запуском механизмов ПКГ приводит и к активации репарации. Учитывая, что основной вид повреждений, вызываемый перекисью водорода – однонитевые разрывы, то, вероятно, в контроле защитные механизмы (увеличение антиапоптотических эффекторов - защита от АКМ, активация ПАРП-полимеразы – защита от повреждений ДНК) не успевали сработать.

По результатам проведенных исследований необходимо отметить, что в иммунокомпетентных клетках больных БА увеличена активность антиапоптотических эффекторов, ингибирующих апоптоз по митохондриальному и по рецепторному пути, и не изменена активность проапоптотических эффекторов. Исследование влияния специфического (дексаметазон) и неспецифического (перекись водорода) индукторов апоптоза приводило к увеличению апоптоза и снижению некроза клеток. Действие индукторов на уровне клетки заключается в реактивации митохондриального и рецепторного механизма апоптоза, запуске альтернативного механизма клеточной гибели. Стимуляция программируемой клеточной гибели отличается у разных типов иммунокомпетентных клеток и зависит от тяжести заболевания. Основная роль в патогенезе БА принадлежит, в большей степени, дефекту клеточной гибели эозинофилов и нейтрофилов.

## ВЫВОДЫ

1. Развитие бронхиальной астмы сопряжено с нарушением реализации программируемой гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови, что проявляется снижением апоптоза и увеличением некроза лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов. Снижение апоптоза и степень увеличения некроза при бронхиальной астме зависят от тяжести заболевания и ассоциированы с уровнем экспрессии мРНК ИЛ-5.

2. Механизм нарушения реализации программируемой гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови при бронхиальной астме обусловлен значительным увеличением антиапоптотических эффекторов апоптоза (Bcl-2, Bfl<sub>1</sub>, Bcl-x<sub>L</sub>, cIAP<sub>1</sub>, cIAP<sub>2</sub>).

3. Изменение баланса между апоптотическими и проапоптотическими эффекторами апоптоза в иммунокомпетентных клетках периферической крови при бронхиальной астме ассоциировано со снижением экспрессии гена и ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора p53 и увеличением экспрессии гена и ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора NF-κB.

4. Действие индукторов апоптоза *in vitro* (специфического – дексаметазон и неспецифического - перекись водорода) приводит к увеличению уровня апоптотической и снижению уровня некротической гибели иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой.

5. Влияние индукторов апоптоза на различные пути реализации программируемой гибели (апоптоз, параптоз) зависит от типа клеток. В эозинофилах индукторы апоптоза приводят к увеличению уровня апоптотической гибели, в лимфоцитах – к развитию и апоптоза, и параптоза, в нейтрофилах – к преобладанию параптотического типа гибели.

## Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Экспрессия мРНК гомологов семейства Bcl-2 и ИЛ-5 в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой // Журнал Российского медицинского университета. Вестник РГМУ.-2003.-№2 (28).-С.143 (совместно с Иванчук И.И., Сорокиной М.А.).
2. Экспрессия мРНК гомологов семейства генов Bcl-2 и интерлейкина-5 в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой // «Науки о человеке»—Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича.—Томск: СибГМУ.—2003.—С.177-178 (совместно с Сорокиной М.А., Иванчук И.И.).
3. Increased interleukin-5 mRNA expression and Bcl-2 depended eosinophils apoptosis suppression in atopic asthmatics // European Respiratory Society. Annual Congress.—Vienna.—2003.—P.455 (совместно с А.Е. Sazonov, I.I. Ivanhuk, F.I. Petrovski, L.M.Ogorodova, V.V. Novitskiy).
4. Экспрессии мРНК апоптоз-ассоциированных факторов в механизмах гибели эозинофилов больных бронхиальной астмой // Сибирский медицинский журнал.—2004.—Т.19.—№4.—С.70—74 (совместно с Иванчук И.И., Сазоновым А.Э., Огородовой Л.М., Петровой И.В., Кармалита Е.Г., Васьковским Н.В., Петровским Ф.И.).
5. Ассоциация полиморфных вариантов генов NO-синтаз с бронхиальной астмой //«Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича.—Томск: СибГМУ.—2004.—С.212-213 (совместно с Петровой И.В., Поповой И.С., Иванчук И.И., Петровским Ф.И.).
6. Изменение экспрессии апоптотических факторов в эозинофилах при бронхиальной астме // «Науки о человеке»—Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича.—Томск: СибГМУ.—2004.—С.200-201 (совместно с Петровой И.В., Поповой И.С., Сазоновым А.Э., Иванчук И.И.).
7. Activity of pro- and antiapoptotic factors mRNA expression in eosinophils of asthmatics // European Respiratory Society. Annual Congress.—Glasgow.—2004.—P.321 (совместно с Ivanhuk I.I., Sazonov A.E., Petrova I.V., Ogorodova L.M.).
8. Экспрессия мРНК мембраносвязанной и растворимой изоформ  $\alpha$ -субъединицы рецептора интерлейкина-5 в индуцированной мокроте и периферической крови больных бронхиальной астмой // Бюллетень Сибирской медицины.—2005.—№1.—С.40—45 (совместно с Сазоновым А.Э., Иванчук И.И., Поповой И.С., Деевым И.А., Орловой Е.В., Першиной А.Г., Хитринской Е.Ю.).
9. Regulatory function of NF-kappaB and p53 on eosinophils apoptosis from atopic asthmatics // European Respiratory Society. Annual Congress.—

Copenhagen.-2005.-P.341 (совместно с Sazonov A.E., Ivanchuk I.I., Petrova I.V.).

10. Экспрессия генов и ДНК-связывающая способность факторов транскрипции NF-kB и P53 в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой // Всероссийская конференция «Фундаментальные науки-медицине».-Новосибирск-2005.-С.85 (совместно с Сазоновым А.Э., Иванчук И.И., Петровой И.В., Деевым И.А., Огородовой Л.М.).

### Список сокращений

АКМ - активные кислородные метаболиты

БА – бронхиальная астма

ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

ГКС – глюкокортикостероиды

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за первую секунду

ПАРП - поли-(АДФ-рибоза) полимеразы

ПК – периферическая кровь

ПК<sub>20</sub> – концентрация метахолина, вызывающая падение ОФВ<sub>1</sub> на 20% и более

ПКГ – программируемая клеточная гибель

ПСВ – пиковая скорость выдоха

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предварительной реакцией обратной транскрипции

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

IgE – иммуноглобулин E

NF-kB - транскрипционный фактор

p53 - транскрипционный фактор

Th – Т-хелпер

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ  
Заказ № \_\_\_\_\_ Тираж \_\_\_\_\_ экз.