На правах рукописи

ИВАНЧУК
Игорь Иванович

МЕХАНИЗМЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ ЭОЗИНОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

14.00.16 – патологическая физиология

Автореферат
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск - 2005

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

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Огородова Людмила Михайловна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Федорова Татьяна Сергеевна**

член-корр. РАМН,
доктор медицинских наук, профессор **Лишманов Юрий Борисович**

доктор медицинских наук, профессор **Жданов Вадим Вадимович**

Ведущая организация:
НИИ общей патологии
и патофизиологии РАМН г. Москва

Защита состоится « » _____ 2005 г. в ___^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Россия, Томск, Московский тр., 2)

С диссертацией можно ознакомится в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Россия, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан « »_____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность проблемы. Согласно современным представлениям бронхиальная астма – заболевание, сопровождающееся хроническим аллергическим воспалением бронхов, обусловливающим повторяющиеся эпизоды бронхиальной обструкции и гиперреактивность дыхательных путей [GINA 2002]. Повсеместно отмечается увеличение распространенности атопических заболеваний, причем достоверные причины роста заболеваемости астмой остаются неизвестными [Чучалин А.Г. 2004; Огородова Л.М. 2002; King M.E., 2004]. Последние годы отмечены тенденцией роста смертности от бронхиальной астмы [Chang, 2004; King M.E., 2004].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении бронхиальной астмы за последнее десятилетие, благодаря пересмотру концепции патогенеза атопических заболеваний, созданию новых классификаций, методов оценки персистирующего воспаления, возможности терапевтических подходов все еще остаются ограниченными, по существу патогенетическими [Ревякина В.А. 1999; Krishna M.T., 2002; Robinson D.S., 2003]. Во многом такая ситуация обусловлена отсутствием полной картины патогенеза атопических болезней и исчерпывающих данных о первичных наследуемых биологических дефектах, приводящих к возникновению и хронизации воспаления, хотя участие полигенных наследуемых факторов в механизмах формирования различных атопических заболеваний не вызывает сомнения [Федосеев Г.Б., 2001; Пузырев В.П., 2002; Cookson W., 2002; Gao P.S., 2004].

Атопия, как иммунобиологический феномен, чрезвычайно распространена в популяции. По данным последних исследований она встречается у 30% - 50% населения в разных странах [GINA 2002; King M.E., 2004]. В то же время распространенность атопических заболеваний, то есть клиническая манифестация атопии, значительно ниже. Данный факт свидетельствует о наличии группы патогенетических факторов, помимо классического признака атопии – гиперпродукции IgE, приводящих к реализации иммунологических нарушений. В этой связи внимание многих исследователей привлечено к молекулярно-генетическим нарушениям, сопровождающим бронхиальную астму, в частности механизмам изменения программируемой гибели клетки.

Интерес к апоптозу обусловлен прежде всего тем, что этот процесс тесно связан с целым рядом сигнал-проводящих систем изменение которых имеет большое патогенетическое значение и для астмы [Chilvers E.R., 1998; Letuve S., 2002; Duncan C.J., 2003; Simon H.U., 2003]. Кроме этого, сигналы, ингибирующие и, напротив, индуцирующие апоптоз, являются ключевыми в патогенезе

бронхиальной астмы (интерлейкины, ростовые факторы, глюкокортикостероиды и т.д.). Снижение апоптотической активности эозинофилов, ключевых эффекторных клеток воспаления при астме, обусловливает их персистенцию в очаге воспаления, что приводит к усилению инфильтрации стенки бронхов эозинофилами и повреждению эпителия дыхательных путей [Kieilman B., 1994; Desreumaux P.,1996; Duncan C.J., 2003; Walsh G.M., 2003].

В работах, посвященных изучению молекулярно-генетических механизмов астмы, чаще всего рассматривается аспект регуляции активности провоспалительных медиаторов. Немного работ посвящено оценке апоптотической гибели эффекторных клеток, однако в большинстве случаев они сводятся к феноменологической оценке апоптоза или изучению активности ограниченного числа проксимальных эффекторов клеточной гибели [Jang A.S., 2000; Fine A., 2000]. Интегральная оценка значения пролиферативной, функциональной и апоптотической активности эффекторных клеток при бронхиальной астме практически отсутствует. В незначительном количестве имеющихся обзоров по данной теме прослеживается ряд противоречий. В частности, практически нет данных об участии продукта гена p53 в патогенезе бронхиальной астмы. В то же время известно, что транскрипционный фактор p53 является универсальным регулятором клеточного цикла, который способен влиять на пролиферацию, функциональную активность клетки, активировать проапоптотические гены, а также подавлять активность антиапоптотических генов [Chang N.S., 2003].

Вышеизложенное определяет актуальность, перспективность и практическую значимость научного поиска в области молекулярных механизмов программируемой гибели клетки как возможного патогенетического фактора при бронхиальной астме.

Цель: установить особенности регуляции и реализации механизмов программируемой гибели эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой.

Задачи:

1. Изучить активность апоптотической гибели эозинофилов периферической крови при бронхиальной астме в зависимости от тяжести заболевания и активности воспаления.
2. Оценить экспрессию проапоптотических (BAX, BAD, BCLXS, AIF) и антиапоптотических (BCL2, BFL1, BCLXL, CIAP1, CIAP2) эффекторов в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой различной тяжести до и после лечения.

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. Исследовать закономерности и механизмы влияния глюкокортикостероидной терапии на уровень про- и антиапоптотических эффекторов в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой.
5. Выявить особенности механизмов реализации программы апоптоза эозинофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести заболевания и активности воспаления.

Научная новизна

Впервые с использованием современных высокоинформативных молекулярно-биологических методов проведена комплексная оценка проапоптотических и антиапоптотических систем в эозинофилах периферической крови больных астмой в зависимости от степени тяжести, в разные периоды заболевания, включая оценку динамики этих эффекторов на фоне ингаляционной глюкокортикостероидной терапии.

Приоритетными являются данные, характеризующие механизм угнетения программируемой гибели эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой, реализующийся через стабильное увеличение экспрессии антиапоптотических эффекторов и их преобладание над проапоптотическими. Степень нарушения программируемой гибели эозинофилов периферической крови ассоциирована с тяжестью заболевания и активностью воспаления при астме.

Впервые показано, что повышенная экспрессия гена ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{Waf1/Cip1}$, независимо от тяжести и периода заболевания, является маркером стабильного нарушения внутриклеточного метаболизма в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой. Обнаруженная отрицательная взаимосвязь $p21^{Waf1/Cip1}$ с показателями апоптотической гибели эозинофилов, сильная положительная корреляция с содержанием эозинофилов в периферической крови больных, с экспрессией мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-5, ГМ-КСФ и антиапоптотическими эффекторами BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2 (обострение и ремиссия) доказывает важную роль $p21^{Waf1/Cip1}$ в реализации провоспалительных и антиапоптотических эффектов при бронхиальной астме.

Новыми являются данные о том, что в эозинофилах больных бронхиальной астмой в период ремиссии, на фоне снижения экспрессии NF-kB–транскрипционно-зависимых провоспалительных и антиапоптотических эф-

факторов существенно повышена ДНК-связывающая способность нуклеарного фактора -kB. Это свидетельствует о том, что фоне ингаляционной глюкокортикостероидной терапии формируется механизм селективной транскрипционной активности NF-kB в отношении провоспалительных и антиапоптотических генов-мишеней.

Приоритетными являются данные о том, что экспрессия гена и ДНК-связывающая активность транскрипционного фактора p53 снижена в эозинофилах периферической крови больных астмой. ДНК-связывающая активность нуклеарного фактора p53 как в период обострения, так и в ремиссию, коррелирует с тяжестью бронхиальной астмы.

Сформулирована новая концепция о роли экспрессии гена p53 и его транскрипционной активности в формировании апоптотического статуса эозинофилов периферической крови больных астмой и его значение в патогенезе бронхиальной астмы.

Впервые показано, что эозинофилы периферической крови больных бронхиальной астмой имеют высокий антиапоптотический статус, что может свидетельствовать о коммитированости антиапоптотического статуса на этапе дифференцировки эозинофилов в костном мозге. Формирование антиапоптотического статуса осуществляется путем селекции эозинофилов с высокой резистентностью к апоптотическим стимулам через механизм посттрансляционной модификации функциональной активности ключевых транскрипционных факторов воспалительного ответа (NF-kB) и программы клеточной гибели (p53).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты проведенного исследования дают возможность разрабатывать мероприятия первичной профилактики бронхиальной астмы, посредством раннего выявлением доклинических состояний у лиц с предрасположенностью к астме, и формировать индивидуальные рекомендации по предупреждению перехода скрытых биологических дефектов в состояние клинической манифестации болезни.

Проведенное комплексное изучение регуляции программируемой гибели эозинофилов больных бронхиальной астмой с выделением характерных апоптоз-ассоциированных синдромов создали весомые предпосылки для использования выявленных особенностей транскрипционной и посттрансляционной регуляции непосредственно в клинической практике.

Установленные в исследовании новые патогенетически важные для астмы молекулярные маркеры могут стать фармакогенетическими мишенями для разработки новых терапевтических подходов в лечении бронхиальной астмы.

Результаты исследований могут быть использованы в процессе последипломного образования аллергологов, иммунологов, пульмонологов.

Положения, выносимые на защиту

1. Содержание эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза снижено у больных бронхиальной астмой. Степень снижения ассоциирована с уровнем экспрессии мРНК ключевых факторов роста и дифференцировки эозинофилов (ГМ-КСФ, ИЛ-5) и с активностью воспаления.
2. Нарушение программы гибели эозинофилов периферической крови при бронхиальной астме реализуется через стабильное увеличение экспрессии антиапоптотических эффекторов, что приводит к снижению апоптоза эозинофилов. Коммитированость антиапоптотического статуса эозинофилов больных астмой наблюдается на уровне периферической крови, что может быть следствием селекции эозинофилов с высокой резистентностью к апоптотическим стимулам на этапе дифференцировки в костном мозге.
3. Апоптозиндуцирующий эффект ингаляционной глюкокортикостероидной терапии у больных легкой и среднетяжелой астмой реализуется путем увеличения экспрессии BCLXS, BAX и снижения активности ингибиторов каспаз CIAP1, CIAP2, следствием чего является активация каспазного каскада апоптотической гибели. У больных тяжелой бронхиальной астмой ведущим проапоптотическим эффектом глюкокортикостероидов является повышение экспрессии апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) и усиление альтернативного пути апоптоза.
4. Базисным механизмом изменения программируемой гибели эозинофилов периферической крови при бронхиальной астме является посттрансляционная модификация функциональной активности ключевых транскрипционных факторов воспалительного ответа (NF-kB) и программы гибели клетки (p53).

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на 68-й итоговой научной сессии КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного научного центра РАМН, г. Курск, 2002 г.; на конференции «Functional Genomics» г. Boston, Massachusetts, США, 2002 г.; на конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 2003, 2004 г.; на Европейском респираторном конгрессе, г. Вена, 2003 г., г. Глазго, 2004 г.; на XIII национальном конгрессе по болезням органов дыхания, г. Москва, 2003 г.; на конгрессе «3-rd Congress of Europian Region International Union against Tuberkulosis and Lung Diseases (IUATLD)» и 13 конгрессе по болезням органов

дыхания, г. Москва, 2004 г.; на IV межрегиональной научно - практической конференции "Здоровье детей - наше будущее!", г. Томск, 2004 г.

Внедрение результатов исследований

Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедре факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета и кафедре биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета, на кафедре патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета и кафедре клинической аллергологии и иммунологии Иркутского государственного института усовершенствования врачей. 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 26 работ, в том числе 11 журнальных статей, из которых 9 представлены в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 210 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов, главы собственных наблюдений и выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 48 рисунками и 36 таблицами. Список источников цитируемой литературы включает в себя 199 работы, из которых 22 отечественных и 177 зарубежных авторов.

Работа выполнена на базе отдела биохимии (зав. отд.- к.м.н. А.Э. Сазонов) и отдела молекулярной биологии (зав. отд. - к.м.н. И.И. Иванчук) Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (зав. ЦНИЛ – профессор, д.м.н. А.Н. Байков), научно-исследовательском учреждении «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (директор института академик Власов В.В), кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета Сибирского государственного медицинского университета (зав. каф.- профессор, д.м.н. Л.М. Огородова), кабинета функциональной диагностики Областного детского центра клинической иммунологии-аллергологии областной детской больницы, г. Томск (зав. каб. - И.А. Деев), Астма-центра областной клинической больницы, г. Томск (гл. врач – к.м.н. Б.Т Серых).

Материалы и методы исследования

Клинические исследования

В период 2000 - 2004 гг. в Областном детском центре клинической иммунологии-аллергологии областной детской больницы и в Астма-центре областной клинической больницы было обследовано 160 человек в возрасте от 14 до 65 лет: 30 здоровых и 130 больных бронхиальной астмой (БА) с легкой (n=30), среднетяжелой (n=42) и тяжелой (n=58) формой заболевания.

Критерии включения пациентов с бронхиальной астмой

- Амбулаторные и стационарные пациенты.
- Возраст пациентов от 14 до 65 лет.
- Положительные результаты кожных аллергопроб.
- Пациенты, имеющие ранее подтверждённый диагноз бронхиальной астмы.

- **1 группа***:* лёгкая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы чаще, чем 1 раз в неделю, но реже чем 1 раз в день; ночные симптомы чаще 2 раз в месяц, но не чаще 1 раза в неделю; вариабельность ПСВ ($ОФВ_1$) 20 – 30%, при этом $ОФВ_1 \geq 80\%$ от должного и ПСВ $\geq 80\%$ от персонального лучшего ($ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за 1 сек., ПСВ – пиковая скорость выдоха);
- **2 группа***:* среднетяжелая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; ночные симптомы чаще 1 раза в неделю; ежедневное использование короткодействующих β2-агонистов; вариабельность ПСВ ($ОФВ_1$) более 30%, при этом $ОФВ_1$ 60 - 80% от должного и ПСВ 60 - 80% от персонального лучшего;
- **3 группа***:* тяжёлая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; частые ночные симптомы; ограничение физической активности; вариабельность ПСВ (ОФВ1) более 30%, при этом $ОФВ_1 \leq 60\%$ от должного и ПСВ $\leq$ 60% от персонального лучшего;

- Пациенты, у которых $ПК_{20}$ (концентрация метахолина, вызывающая падение $ОФВ_1$ на 20% и более) в метахолиновом тесте < или = 8 мг/мл;
- Пациенты, не получавшие (в течение последнего месяца) терапии следующими препаратами: глюкокортикостероиды (системные, ингаляционные,

топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β_2 – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб;

- Пациенты, не имевшие острых респираторных заболеваний в течение предшествующих включению в исследование 4 недель;

Пациенты, умеющие правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, способные адекватно оценивать своё состояние, а также своевременно и верно заполнять дневники самоконтроля (ПСВ – утро, вечер; оценка дневных и ночных симптомов).

Критерии включения в контрольную группу

Возраст пациентов от 14 до 65 лет; отрицательные аллергопробы; IgE < 100 МЕ/мл; отсутствие аллергических заболеваний на момент включения и в анамнезе; пациенты, не получавшие (в течение последнего месяца) терапии следующими препаратами: глюкокортикостероиды (системные, топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β_2 – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб. Пациенты, не имевшие острых респираторных заболеваний.

Для лечения БА применялись следующие фармакотерапевтические режимы: **группа 1** (больные лёгкой персистирующей БА): флутиказона пропионат 200 мкг/сутки; сальбутамол 100 мкг – по требованию; **группа 2** (больные среднетяжелой персистирующей БА): серетид 50/100 х 2/сутки; сальбутамол 100 мкг – по требованию; **группа 3** (больные тяжелой персистирующей БА): серетид 50/250 х 2/сутки; сальбутамол 100 мкг – по требованию.

Больные атопической БА были обследованы в период обострения (до лечения) и ремиссии (спустя 12 недель после начала лечения).

Исследование функции легких

Оценка функциональных тестов была проведена во всех группах пациентов. Для оценки характера нарушений ФВД и доказательства обратимости бронхообструкции были определены $ОФВ_1$ (спирометрия) и ПСВ (пикфлоуметрия). Исследование проводилось утром, использовались 3 попытки, регистрировалась наилучшая. Для оценки уровня неспецифической бронхиальной гиперреактивности проводилась метахолиновая проба ($ПК_{20}$). Функцию легких оценивали с использованием спирографа MasterScope (Erich Jaeger GMBH, Германия) в соответствии с требованиями Американского торакального общества.

Получение периферической крови

Периферическую (венозную) кровь забирали из локтевой вены утром, натощак в стерильную пробирку, содержащую 2,5 мл 3% раствора ЭДТА, в объеме 10 мл.

Определение абсолютного и относительного содержания эозинофилов в периферической крови

Относительное и абсолютное содержание эозинофилов определяли общепринятыми методами [Новицкий В., 1999].

Определение неспецифического IgE в сыворотке крови

Определение неспецифического IgE в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью стандартного набора реагентов «Вектор БЕСТ IgE – ИФА – БЕСТ – стрип» согласно приложенной инструкции.

Определение уровня ИЛ-5

Определение свободного ИЛ-5 в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием стандартного набора реагентов «CYTELISA-IL-5» согласно приложенной инструкции.

Определение уровня ГМ-КСФ

Определение ГМ-КСФ в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием стандартного набора реагентов «Pro Con GM-CSF» согласно приложенной инструкции.

Получение обогащенной суспензии ядросодержащих клеток из периферической крови

Полученную кровь с 3% ЭДТА (4:1), инкубировали 45-60 мин при температуре 37°С. Образовавшийся над эритроцитами слой плазмы осторожно собирали пастеровской пипеткой и переносили в стерильную пробирку. Добавляли 0,9% NaCl (1:1) и центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Затем удаляли супернатант и повторяли процедуру. Супернатант сливали, осадок использовали для дальнейшего исследования.

Выделение эозинофилов из периферической крови

Выделение эозинофилов проводили на трех градиентах плотности фиколла

(молекулярная масса 400000) и 35% раствора урографина : 1,082, 1,092 и 1,115 г/см^3. Клетки над выбранными градиентами плотности (1,115 - эозинофилы нормальной плотности; 1,092 - эозинофилы высокой плотности) собирали пипеткой в центрифужную пробирку и дважды отмывали раствором Хенкса [Берестецкий А. Б., 1997].

Культивирование эозинофилов

Для культивирования использовали культуральную среду следующего состава: среда RPMI – 1640 (Sigma, USA), 10% эмбриональная бычья сыворотка, 100 ЕД/мл пенициллина. Эозинофилы ресуспендировали в 200 мкл культуральной среды, определяли клеточность и жизнеспособность и помещали в лунки микропланшеты. Инкубировали при 37^{o}C в течение 24 часов. Мазки готовили после 24-часового культивирования клеток [Kravtsov V., 1998].

Оценка жизнеспособности клеток (с трипановым синим)

Для определения числа эозинофилов в суспензии и их жизнеспособности использовали 1% раствор трипанового синего на изотоническом растворе хлорида натрия. Подсчет клеток производили в камере Горяева. Окрашивание клеток трипановым синим расценивали как признак необратимого повреждения плазматической мембраны.

Оценка содержания фрагментированной ДНК клеток периферической крови

Для выделения клеточных ядер использовали метод, описанный Сун [Sun D.Y., 1993]. Изолированные ядра центрифугировали при 200g 10 мин. Супернатант сохраняли. Осадок дополнительно лизировали и центрифугировали при 10000g в течение 20 мин и 4 ^{0}C. Супернатант собирали и сохраняли, осадок ресуспендировали в 0,5 мл того же раствора. Преципитацию ДНК проводили в 75 % этиловом спирте при 4 ^{0}C в течение ночи. Содержание ДНК в осадке и супернатанте оценивали на спекрофотометре СЭФ-56 при длинах волн 260, 280, 320 нм. Процент фрагментированной ДНК определяли отношением количества ДНК в супернатанте к общему количеству ДНК (осадок и супернатант) [McCarthy N.J., 1998].

Электрофорез ДНК эозинофилов периферической крови

Данный метод использовали для качественной оценки апоптотической гибели клеток. Выделение ДНК для электрофореза проводили по методу Мармура

[Marmur J., 1961]. Электрофорез ДНК проводили в 1,5 % агарозе с добавлением 1 мкг/мл бромистого этидия при напряжении 20 В/см в течение 15-30 мин. Гель фотографировали под ультрафиолетовой лампой. На электрофореграммах апоптотическая фрагментация ДНК выглядела как «лесенка» из фрагментов ДНК различной длины. Неспецифическая фрагментация ДНК (в случае некротической гибели клеток) представляла собой сплошную светящуюся полосу. Полоса свечения интактной ДНК находилась в районе старта.

Цитоморфологический анализ апоптотической гибели клеток

Морфологический анализ апоптотической гибели клеток проводили на препаратах, приготовленных из культуральной суспензии эозинофилов по общепринятой методике. Мазки окрашивали по Нохта-Максимову (азур II-эозин). Анализ препаратов проводили на микроскопе «БИОЛАМ» (Россия) при увеличении об. 90 х ок. 10. При анализе использовали критерии, характеризующие кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках [Allen R.T., 1997]. Подсчитывали не менее 200 клеток.

Оценка апоптотической гибели клеток с помощью люминесцентной микроскопии

Исследуемый клеточный материал после промывки холодным раствором Хенкса инкубировали при 37 ^{0}С в темном месте 10-20 мин с раствором, содержащим 1:10000 водного раствора акридинового оранжевого. Подсчитывали число жизнеспособных (со слабо флюоресцирующим ядром) и мертвых (ярко флюоресцирующее ядро) элементов на 100 клеток [Allen R.T., 1997].

Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК)

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках «QIAGEN RNA/DNA» (QIAGEN, Германия). Принцип метода основан на связывании РНК с сорбентом с последующей ее элюцией специальным буфером. Выделение проводили согласно приложенной инструкции.

Анализ экспрессии мРНК

Из тотальной РНК получали полиА-РНК (мРНК). Выделение проводили на колонках с олиго-dT целлюлозой (ICN, США). РТ-ПЦР выполняли с помощью набора «Titan One Tube RT-PCR System» (Roche Diagnostics, Германия) согласно приложенной инструкции. Амплификацию ДНК проводили с исполь-

зованием специфических праймеров для AIF, BAD, BAX, BCL2, BCLXL/S, BFL1, CIAP1, CIAP2, ИЛ-5, ГМ-КСФ, NF-kB, p21, p53. Все праймеры синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе («Биосет», Новосибирск).

Для каждой пары праймеров подбирали соответствующую концентрацию Mg и программу амплификации. Экспрессию мРНК оценивали полуколичественно в сравнении с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФДГ). Ген этого фермента относится к постоянно экспрессирующим (house keeping) генам, и его экспрессия является стабильной и постоянной во всех клетках организма. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 2% агарозном геле. Изображения электрофореграмм получали с использованием стационарной видеосистемы и обрабатывали при помощи компьютерной программы «Biotest D» с целью получения количественной информации по каждой пробе. Для каждой пробы результат оценки экспрессии мРНК ГАФДГ принимали в качестве эталонной пробы, а количественное значение – за 100%.

Оценка ДНК-связывающей способности транскрипционных факторов (EMSA – анализ)

В работе была исследована ДНК-связывающая способность транскрипционных факторов NF-kB и p53. Экстракцию белка проводили методом Bohrer [Bohrer H., 1997].

Реакцию связывания проводили в пробирках (200 мкл) содержащих: 1 мкл (20 нг/мкл) каждой олигонуклеотидной последовательности, содержащей сайты связывания (5'-CACCTCAGAC ATGTCTGGAG ACCCTAGGAC GACAAGCCCA GGGCA-3') для p53 и (5’- TGAGGGGACTTTCCCA –3’) для NFkB, 2 мкл экстракта ядерного белка, 2 мкл 5-кратного связывающего буфера (20% глицерина, 5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM ЭДТА, 2,5 mM ДДТ, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,25 мг/мл poly(dI-dC)) и 5 мкл деионизованной воды. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при температуре 37°С. Параллельно ставили пробу контроля специфичности, содержащую 100-кратную концентрацию каждого двухцепочечного олигонуклеотида, без экстракта ядерного белка, и стандартный контроль, содержащий 1 мкл двухцепочечного олигонуклеотида с сайтом связывания для неиндуцибильного транскрипционного фактора ОСТ-1 (5'– TGTCGAATGCAAATCACTAGAA - 3'). ДНК-протеиновые комплексы были фракционированы в 6% полиакриламидном геле. Детекцию ДНК-протеиновых комплексов проводили в УФ трансиллюминаторе, после окрашивания геля флюоресцентным красителем SYBR Green I. Изображения электрофореграмм получали с использованием стационарной видеосистемы и обра-

батывали при помощи адаптированной компьютерной программы «Biotest D» с целью получения количественных данных ДНК-связывающей способности факторов транскрипции. Для каждой пробы результат оценки ДНК-связывающей способности факторов транскрипции ОСТ-1 принимали в качестве эталонной пробы, а количественное значение – за 100%. Исследование было выполнено в НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва (директор, д.м.н., профессор, академик РАМН Кубатиев А.А).

Трансмиссионная электронная микроскопия

Предварительную подготовку выделенных эозинофилов проводили стандартным методом [Карупу В.Я., 1984]. Срезы готовили на ультрамикротоме Ultratome-III (LKB, Швеция). Срезы окрашивали 2% раствором уранилацетата в 50% этаноле и цитратом свинца по Рейнольдсу [Reynolds E.S., 1963]. Просмотр и фотографирование срезов проводили на электронном микроскопе JEM-100 CX II (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Статистическая обработка результатов

Математические расчеты проводили с помощью пакета программ “Statistica for Windows 5.0”. Вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (s). В связи с тем, что распределение полученных цифровых данных не соответствовало нормальному для выявление межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для выявления наиболее значимых показателей, по которым наблюдались межгрупповые различия, был проведен пошаговый дискриминантный анализ. Для выявления зависимости между группами факторов были проведены факторный, регрессионный и кластерный анализы. Для оценки корреляционных связей использовали коэффициент корреляции рангов Спирмена. Изменения считались значимыми при достоверности $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение

Клинико-функциональная характеристика больных бронхиальной астмой

Клинические и параклинические исследования были выполнены во всех группах пациентов (больные легкой, среднетяжелой и тяжелой БА). Оценка функциональных тестов ($ОФВ_1$, ПСВ, $ПК_{20,}$) была проведена для верификации диагноза БА и оценки эффективности лечения. Было установлено, что терапия ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) оказалась эффективной во

всех группах и привела к значительной положительной динамике показателей функции легких.

Помимо проведения функциональных тестов у пациентов было определено абсолютное и относительное содержание эозинофилов в периферической крови. Динамика абсолютного и относительного содержания эозинофилов в целом совпадала, поэтому при анализе результатов был использован показатель относительного содержания эозинофилов. Лечение привело к снижению уровня эозинофилов в периферической крови.

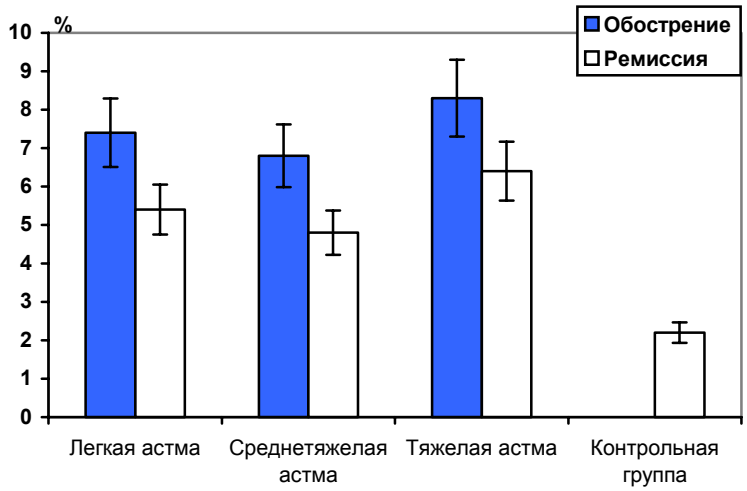

Рис. 1. Количество эозинофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой до и после лечения

Однако ни в одной из исследуемых групп этот показатель не достиг значений контроля (рис. 1).

В результате морфологической оценки апоптоза эозинофилов периферической крови больных БА установлено значительное снижение количества клеток с морфологическими признаками апоптоза по сравнению с показателями в группе контроля (рис.2).

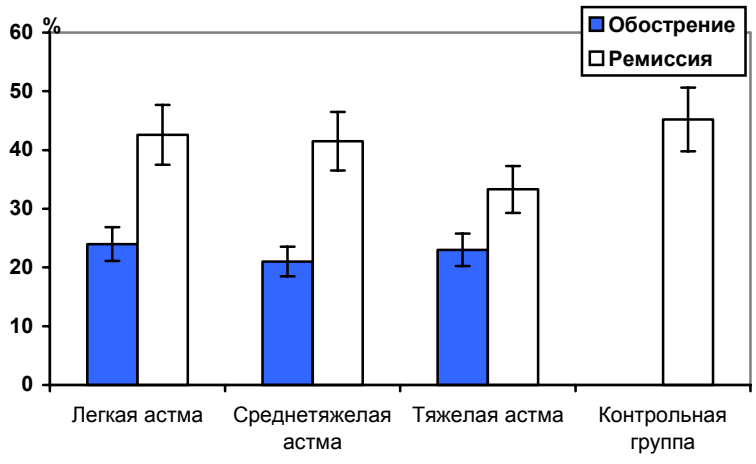

Рис. 2. Содержание апоптотических эозинофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой до и после лечения

Наблюдаемое количество эозинофилов с признаками апоптотической морфологии в группах больных легкой и среднетяжелой астмой после курса ИГКС не отличалось от значений в контроле, в то время как у пациентов с тяжелой астмой значения апоптотической гибели эозинофилов оставались после лечения на низком уровне как в сравнении с легкой и среднетяжелой астмой, так и с показателями в контроле (рис. 2).

По результатам дискриминантного, регрессионного и кластерного анализов установлено, что активность апоптотической гибели эозинофилов в большей степени взаимосвязана с показателями функции внешнего дыхания у больных БА. Не отмечено зависимости показателя апоптоза эозинофилов от степени тяжести в период обострения БА.

В период ремиссии наблюдалась достоверная корреляция этого показателя со степенью тяжести (коэффициент Спирмена r=0,34, p=0,001). Показана обратная зависимость значений апоптоза эозинофилов до лечения с показателями гиперреактивности ($ПК_{20}$) после лечения (коэффициент корреляции Спирмена r =-0,36, p= 0,0004). Отмечена корреляция между апоптозом эозинофилов после лечения и значениями ПСВ как до, так и после лечения (коэффициенты корреляции Спирмена r=0,25, p=0,02 и r=0,25, p=0,01 соответственно).

При оценке уровня общего IgE у больных БА установлено, что данный признак, в первую очередь, отражает патогенетическую структуру заболевания в представленной выборке пациентов. Значения общего IgE у больных БА (легкая форма – 366,3±34,6 МЕ/мл; среднетяжелая – 424,7±37,3 МЕ/мл; тяжелая – 350,5±19,9МЕ/мл) достоверно превышали уровень указанного показателя у представителей группы контроля (47,6±2,7МЕ/мл). Не было выявлено достоверных различий в группах с различной степенью тяжести заболевания.

Экспрессия мРНК экстраклеточных регуляторов апоптотической гибели эозинофилов у больных бронхиальной астмой

К ключевым факторам, влияющим на индекс пролиферация/апоптоз эозинофилов при БА, относят ИЛ-5 и ГМ-КСФ. Кроме этого ИЛ-5 стимулирует дифференцировку эозинофилов из костномозговых клеток-предшественников, активирует их дегрануляцию и высвобождение активных продуктов воспаления [Baldwin G.C., 1992; Robinson D., 1993].

В результате предварительной оценки уровня экспрессии мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ в клетках периферической крови установлен достаточный для анализа уровень экспрессии этих генов как в группах больных БА так и в контроле (рис. 3). Это позволило включить все выше перечисленные регуляторные факторы в изучаемые показатели во всех исследуемых в данной работе группах.

Проведенный корреляционный анализ между значениями активности мРНК ИЛ-5, ГМ-КСФ в эозинофилах периферической крови и их содержанием в сыворотке крови у больных БА, установленным методом ИФА, выявил достоверную взаимосвязь между этими показателями. Так, коэффициент корреляции Спирмена между экспрессией мРНК ИЛ-5 и уровнем его продукта в сыворотке

крови составил r=0,94, p<0,001, для ГМ-КСФ установлено значение r=0,82, p<0,001.

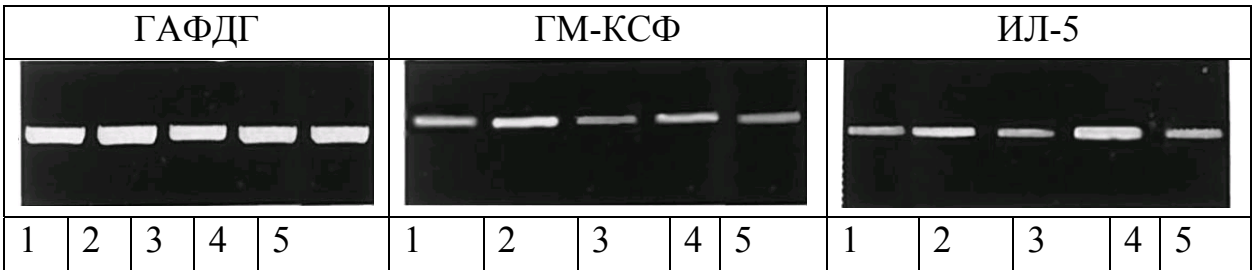

Рис. 3. Пример электрофореграммы. Экспрессия мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ у больных БА. 1 – контроль; 2 – больные легкой БА; 3 - больные легкой БА после лечения; 4 - больные тяжелой БА; 5 - больные тяжелой БА после лечения. ГАФДГ - глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (контроль экспрессии)

Данный факт позволил нам в дальнейшем адекватно экстраполировать значения экспрессии мРНК как реальные показатели содержания цитокинов у больных БА.

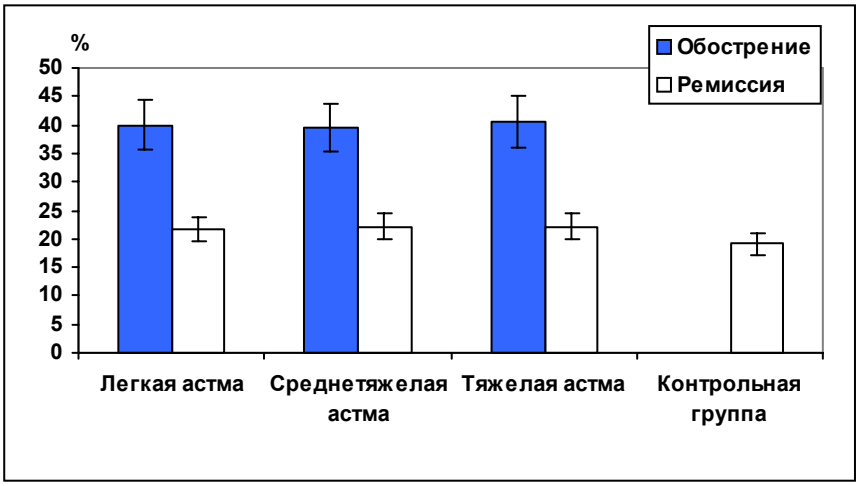

Рис. 4. Экспрессия мРНК ИЛ-5 у пациентов с легкой, среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой до и после лечения

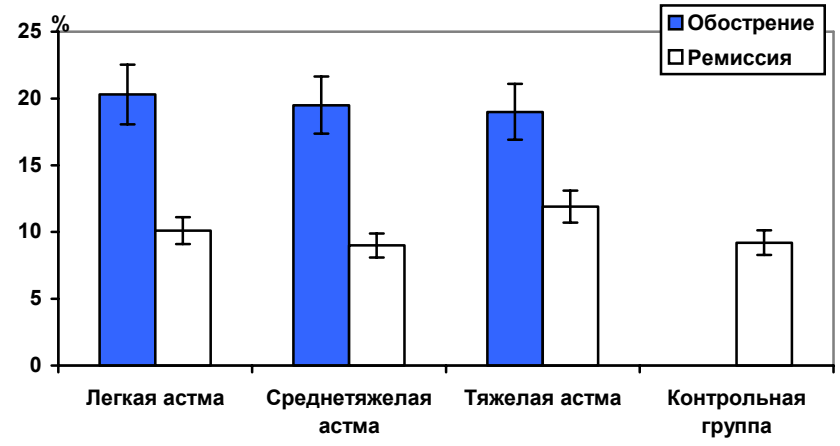

Рис. 5. Экспрессия мРНК ГМ-КСФ у пациентов с легкой, среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой до и после лечения

В результате оценки экспрессии мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ зарегистрировано двукратное увеличение данных показателей в периоде обострения у больных БА по сравнению со значениями в группе контроля (p<0,001) (рис. 4, 5). Оценка исследуемых параметров в период ремиссии показала существенное снижение экспрессии мРНК ИЛ-5, и ГМ-КСФ (p<0,001) у больных БА (рис. 4, 5). Вместе с тем экспрессия мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ в группе больных легкой (p=0,08; p=0,52, соответственно) и сред-

нетяжелой (p=0,06; p=0,37, соответственно) астмой не только существенно снизилась по сравнению с показателями до лечения, но и не отличалась от значений в группе контроля. Экспрессия мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ у больных тяжелой астмой, несмотря на значительное снижение после курса терапии, по-прежнему оставалась достоверно выше значений в контроле (рис. 4, 5).

В результате факторного анализа показателей как до, так и после лечения были выделены две главных компоненты (табл. 1). В период обострения БА в первый фактор вошли параметры, характеризующие обструкцию бронхов (ОФВ1, ПСВ) - «фактор обструкции». Структура второго фактора включала в себя показатели экспрессии цитокинов воспаления (ИЛ-5, ГМ-КСФ). В целом экспрессия ИЛ-5 и ГМ-КСФ определяет активность пролиферации, дифференцировки и силу ответа клеток воспаления, участвующих в патогенезе БА. В связи с этим второй фактор может быть назван как «фактор регуляции клеточного ответа».

Таблица 1

Факторный анализ функциональных и лабораторных тестов у больных БА в период обострения и ремиссии

Обострение				Ремиссия			
Фактор 1		Фактор 2		Фактор 1		Фактор 2	
Показатель	Факторная нагрузка	Показатель	Факторная нагрузка	Показатель	Факторная нагрузка	Показатель	Факторная нагрузка
ОФВ1	-0,88	ИЛ-5	0,70	Апоптоз	0,73	ОФВ1	0,88
ПСВ	-0,91	ГМ-КСФ	0,80	ИЛ-5	-0,84	ПСВ	0,78
				ГМ-КСФ	-0,93		

Анализ исследуемых показателей, полученных после лечения, также позволил выделить два основных фактора. Однако необходимо отметить, что в период ремиссии показатели, определяющие обструкцию бронхов (ОФВ1, ПСВ) вошли в фактор 2, причем с положительным знаком влияния на «фактор обструкции». Структура первого фактора включила в себя показатели экспрессии мРНК ИЛ-5 и ГМ-КСФ. Кроме того, в первый фактор с положительной корреляцией вошел показатель активности апоптотической гибели эозинофилов. В соответствии с этим обозначение данного компонента как «фактор регуляции клеточного ответа» можно считать обоснованным. При этом значения апоптотической гибели эозинофилов тесно связаны с экспрессией мРНК ГМ-КСФ, что подтверждается анализом корреляционных связей между этими показателями (коэффициент корреляции Спирмена r=-0,69, p<0,001). Следует отметить также высокий уровень корреляции между экспрессией ИЛ-5 и активно-

стью апоптоза эозинофилов (коэффициент корреляции Спирмена r=-0,4, p<0,001).

Таким образом, содержание эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза снижено у больных БА. Степень снижения ассоциирована с уровнем экспрессии мРНК ключевых факторов роста и дифференцировки эозинофилов (ГМ-КСФ, ИЛ-5), а также с активностью воспаления.

Активность экспрессии мРНК про- и антиапоптотических эффекторов в эозинофилах у больных бронхиальной астмой

Развитие апоптотической гибели клетки зависит от внутриклеточного баланса про- и антиапоптотических эффекторов. В настоящее время к ключевой внутриклеточной системе регуляции апоптоза относят семейство BCL2-белков, которое включает в себя агонистов (BAX, BCLXS, BAD) и антагонистов апоптоза (BCLXL, BCL-2, BFL-1). Не менее важное значение в механизмах апоптоза имеет система проксимальных ингибиторов каспаз, к которой относятся протеины из семейства IAP (CIAP1, CIAP2). Значительна роль системы, обеспечивающей альтернативный (каспаз-независимый) механизм программируемой клеточной гибели, ключевым эффектором которой является апоптоз-индуцирующий фактор (AIF). Таким образом, соотношение в активности всех вышеперечисленных систем эффекторов в конечном итоге определяет динамику и тип клеточной гибели.

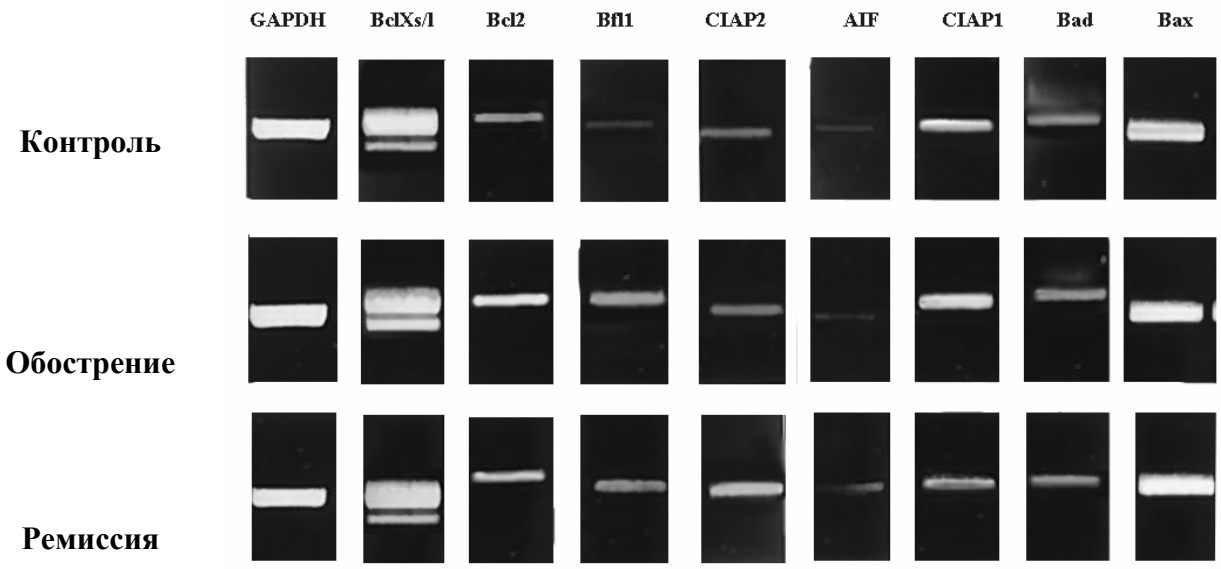

Рис. 6. Пример электрофореграммы. Экспрессия мРНК про- и антиапоптотических эффекторов у больных БА

В результате предварительной оценки уровня экспрессии мРНК проапоптотических (BAX, BCLXS, BAD, AIF) и антиапоптотических (BCLXL, BCL-2, BFL-1, CIAP1, CIAP2) эффекторов в эозинофилах периферической крови больных астмой установлен достаточный для анализа уровень экспрессии данных генов как в группах больных БА, так и в контроле (рис. 6). Это позволило включить все эффекторы в изучаемые показатели во всех исследуемых группах.

В результате оценки экспрессии мРНК про- и антиапоптотических эффекторов в общей выборке больных БА установлено значительное увеличение активности мРНК таких антиапоптотических факторов как BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2 по сравнению с показателями в контроле (рис. 7).

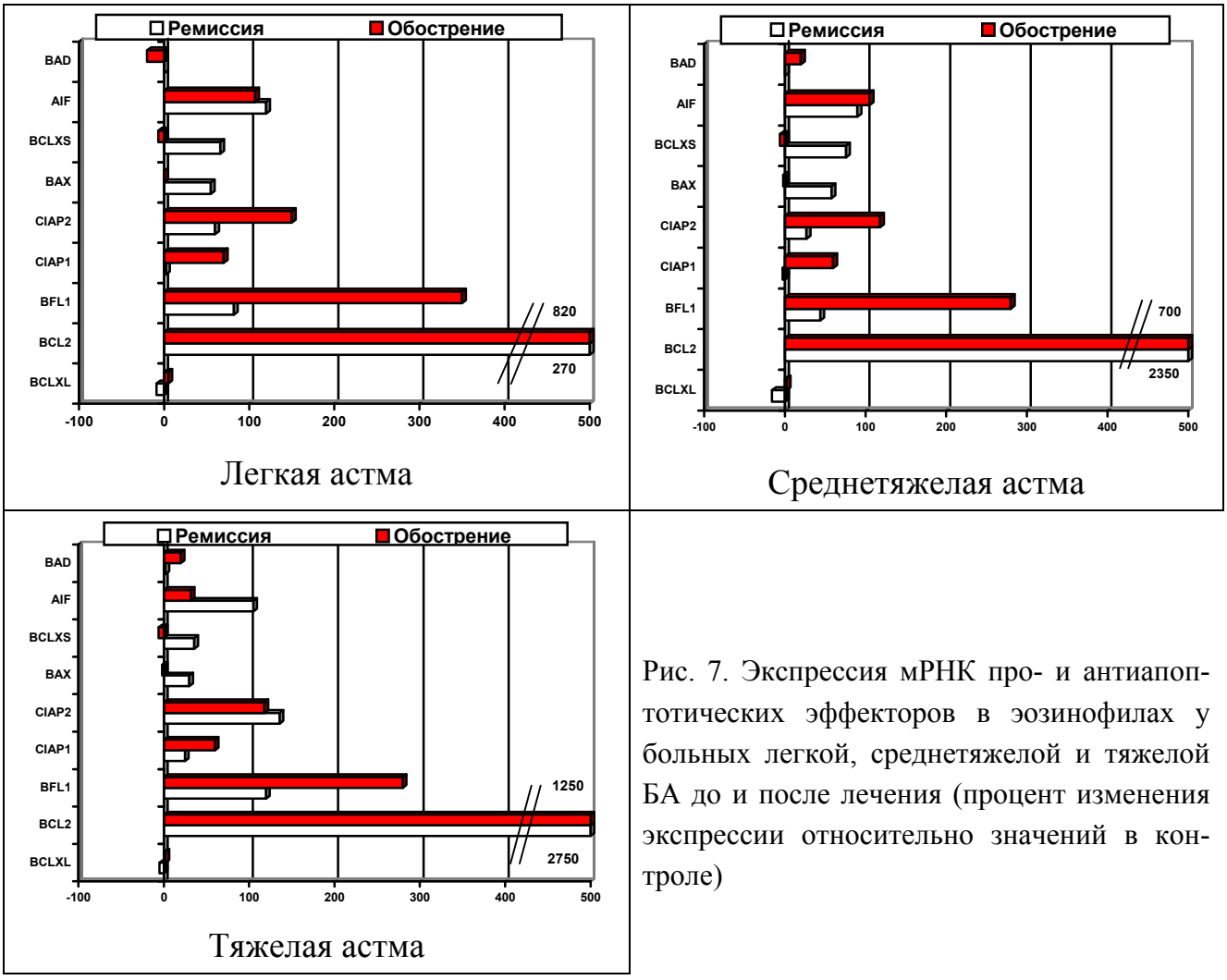

Рис. 7. Экспрессия мРНК про- и антиапоптотических эффекторов в эозинофилах у больных легкой, среднетяжелой и тяжелой БА до и после лечения (процент изменения экспрессии относительно значений в контроле)

Необходимо отметить порядковое увеличение у больных БА экспрессии ключевого антиапоптотического эффектора BCL2 (11,05±0,20 % против 0,40±0,09 % в контроле) и кратное увеличение активности мРНК BFL1 (16,3±0,62 % при значении в контроле 3,40±0,17 %) (рис. 7).

В противоположность антиапоптотическим эффекторам, активность мРНК проапоптотических эффекторов у больных БА была сопоставима с таковыми в группе контроля. Некоторое увеличение экспрессии мРНК у больных БА было отмечено только для проапоптотического эффектора BAD.

После лечения в группе больных легкой и среднетяжелой БА установлено значительное повышение уровня мРНК BAX, BCLXS ($p<0,05$) и снижение экспрессии BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1 и CIAP2 ($p<0,05$), при этом отмечалась нормализация показателя апоптотической гибели эозинофилов. Данные результаты свидетельствуют об обратимости состояния нарушенного апоптоза при легкой и среднетяжелой БА на фоне терапии ИГКС. У больных тяжелой БА экспрессия антиапоптотических эффекторов (BCL2, BFL1, CIAP1 и CIAP2) оставалась повышенной и после лечения. Во всех группах больных отмечалось значительное повышение эффектора альтернативного пути апоптоза AIF, как в период обострения так и в ремиссию (рис. 7).

Таким образом, активная экспрессия антиапоптотических эффекторов BCLXL, BCL2, BFL1 существенно снижает вероятность реализации митохондриального пути апоптоза, а высокий уровень мРНК CIAP1, CIAP2 блокирует и рецепторный механизм программы клеточной гибели в эозинофилах больных БА. У больных легкой и среднетяжелой бронхиальной астмой в период обострения программа клеточной гибели реализуется главным образом через активацию апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) - альтернативного механизма апоптоза, а в ремиссии ключевым является активация рецепторного пути за счет снижения экспрессии ингибиторов каспаз CIAP1 и CIAP2, что в целом приводит к увеличению апоптоза эозинофилов до значений в контроле. Тяжелая бронхиальная астма в период обострения характеризуется драматическим повышением экспрессии антиапоптотических (BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2) и снижением проапоптотических (BCLXS) эффекторов в эозинофилах периферической крови. На фоне лечения наблюдается некоторая активация митохондриальных эффекторов апоптоза (BCLXS, BAX), однако в условиях повышенной экспрессии ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2) ключевым механизмом реализации программы клеточной гибели становится повышение экспрессии апоптоз-индуцирующего фактора (AIF).

По результатам трансмиссионной электронной микроскопии в эозинофилах больных БА установлены морфологические признаки соответствующие параптотическому типу гибели (рис. 8). В частности, характерными признаками альтернативного пути развития программируемой гибели клетки является кон-

денсация хроматина без фрагментации ядра, вакуолизация цитоплазмы и набухание митохондрий.

Таким образом, результаты трансмиссионной электронной микроскопии, наряду с установленным высоким уровнем экспрессии AIF, свидетельствуют о преобладание альтернативных механизмов в развитие программы гибели эозинофилов периферической крови больных БА.

Экспрессия мРНК регуляторов программируемой клеточной гибели в эозинофилах больных бронхиальной астмой

Ключевым регулятором пролиферативной и апоптотической активности в клетке является продукт гена p53, который относится к транскрипционным факторам и способен активировать проапоптотические гены, а также подавлять активность антиапоптотических генов. Наряду с этим, p53 способен регулировать фактор транскрипции NF-kB, активация которого приводит к продукции широкого спектра провоспалительных цитокинов и антиапоптотических эффекторов. Белок $p21^{Waf1/Cip1}$ является p53-транскрипционнозависимым и относится к ингибиторам циклинзависимых киназ из семейства Cip/Kip [Le N. T.V, 2003]. Высокий уровень $p21^{Waf1/Cip1}$ повышает резистентность клетки к оксидативному стрессу, подавляет транскрипционную активность p53 и уменьшает чувствительность клетки к апоптотическим сигналам [Javelaud D., 2002].

В результате оценки экспрессии мРНК p53 у больных БА установлено почти двухкратное изменение данного показателя в период обострения по сравнению со значениями в группе контроля. В ремиссию у больных легкой и среднетяжелой астмой уровень мРНК p53 достоверно повысился по сравнению с обострением и практически не отличался от контрольных значений (табл. 2). У больных тяжелой астмой терапия ИГКС не привела к изменению экспрессии мРНК p53. Уровень мРНК p53 в эозинофилах больных тяжелой БА был значительно ниже, чем у больных легкой и среднетяжелой БА.

Таблица 2

Уровень мРНК p53, NF-kB и $p21^{Waf1/Cip1}$ в эозинофилах больных бронхиальной астмой (M ± m, U-тест Манна-Уитни)

Группы пациентов	p53, %		NF-kB,%		$p21^{Waf1/Cip1}$,%	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия

Легкая астма n=30	2,70±0,22 Рс= 0,25 Рт=0,02 Рк<0,001	3,62±0,47 Рс= 0,18 Рт<0,001 Рк=0,76	21,00±0,54 Рс= 0,009 Рт<0,001 Рк= 0,003	21,29±0,67 Рс= 0,38 Рт= 0,25 Рк= 0,07	15,70±0,80 Рс=0,03 Рт=0,052 Рк<0,001	13,20±0,89 Рс= 0,18 Рт=0,045 Рк<0,001
Среднетя-желая астма n=42	2,76±0,20 Рт=0,01 Рк<0,001	3,35±0,40 Рт<0,001 Рк=0,23	22,80±0,67 Рт= 0,005 Рк<0,001	20,76±0,69 Рт= 0,23 Рк=0,11	13,90±0,92 Рт = 0,01 Рк=0,03	11,20±0,75 Рт = 0,02 Рк=0,03
Тяжелая астма n=58	2,06±0,18 Рк<0,001	1,84±0,34 Рк<0,001	25,95±0,47 Рк<0,001	21,57±0,38 Рк=0,02	16,10±0,54 Рк<0,001	14,30±0,51 Рк<0,001
Контроль-ная группа, n=30	4,22±0,20		18,29±0,40		9,22±0,43	

Примечание: Рк - значимость различий при сравнении с показателями в контрольной группе; Рс - значимость различий при сравнении с показателями у пациентов со среднетяжелой астмой; Рт - значимость различий при сравнении с показателями у пациентов с тяжелой астмой

Экспрессия мРНК нуклеарного фактора кВ возрастала прямо пропорционально тяжести заболевания. Причем в обострении во всех группах пациентов БА этот показатель был выше чем в контроле. На фоне лечения уровень мРНК NF-kB достоверно снизился только в группе тяжелой БА, но остался повышенным по сравнению с контрольными значениями.

При оценке экспрессии мРНК $p21^{Waf1/Cip1}$ у больных БА установлено существенное увеличение уровня этого гена. В период ремиссии экспрессия гена $p21^{Waf1/Cip1}$ значимо снижалась у больных легкой, среднетяжелой и тяжелой БА по сравнению с показателями до лечения, однако во всех группах уровень мРНК $p21^{Waf1/Cip1}$ по-прежнему оставался существенно выше контрольных значений.

Оценка функциональной активности факторов транскрипции (NF-kB и p53)

Для оценки функциональной активности нуклеарных факторов (NF-kB и p53) в эозинофилах больных БА был проведен EMS-тест (electrophoretic-mobility-shift). Оценка ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора NF-kB была выполнена у 36 больных БА до лечения и в период ремиссии (рис. 9).

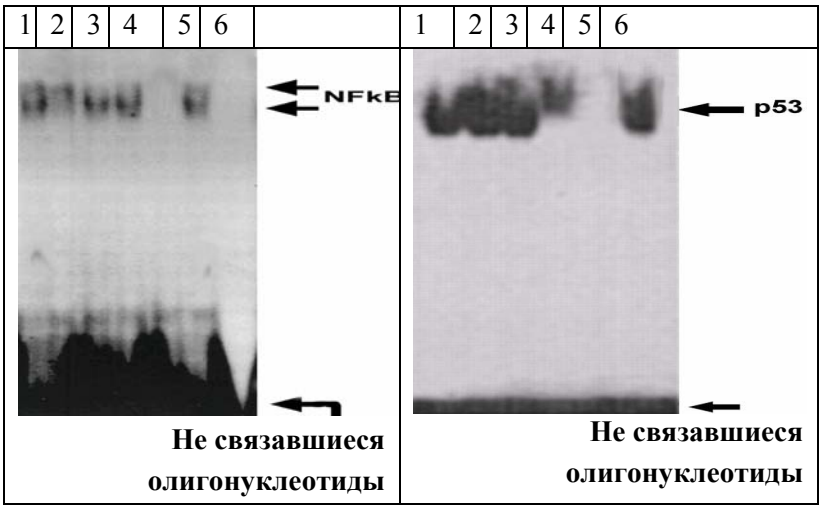

Рис. 9. Пример электрофореграммы EMS-теста для факторов транскрипции NF-kB и p53. ДНК-связывающая активность NF-kB и p53 в эозинофилах здоровых доноров (линия 1), больных легкой (линия 2), среднетяжелой (линия 3) и тяжелой (линия 4) БА в период обострения. Линия 5 – контроль специфичности (100-кратная концентрация двухцепочечного олигонуклеотида). Линия 6 – стандартный контроль (неиндуцибельный транскрипционный фактор OCT-1)

Функциональная активность нуклеарного фактора p53 исследована у 37 больных БА в период обострения и ремиссии. EMS-тест нуклеарных факторов был выполнен также у 10 здоровых доноров.

У больных БА в период обострения установлено статистически значимое повышение ДНК-связывающей способности NF-kB и двукратное снижение функциональной активности транскрипционного фактора p53 по сравнению с показателями в контроле (рис. 10). Межгрупповой анализ различий ДНК-связывающей способности транскрипционного фактора NF-kB у больных БА в период обострения показал, что при всех формах БА данный параметр был существенно выше значений в контрольной группе. Между группами больных легкой, среднетяжелой и тяжелой БА статистически значимых различий по данному показателю не установлено.

Следует отметить, что вопреки ожидаемому, после терапии ИГКС, ДНК- связывающая способность нуклеарного фактора -kB повысилась в 1,4 раза по сравнению с показателями до лечения и стала в 2 раза выше контрольных значений (рис. 10А).

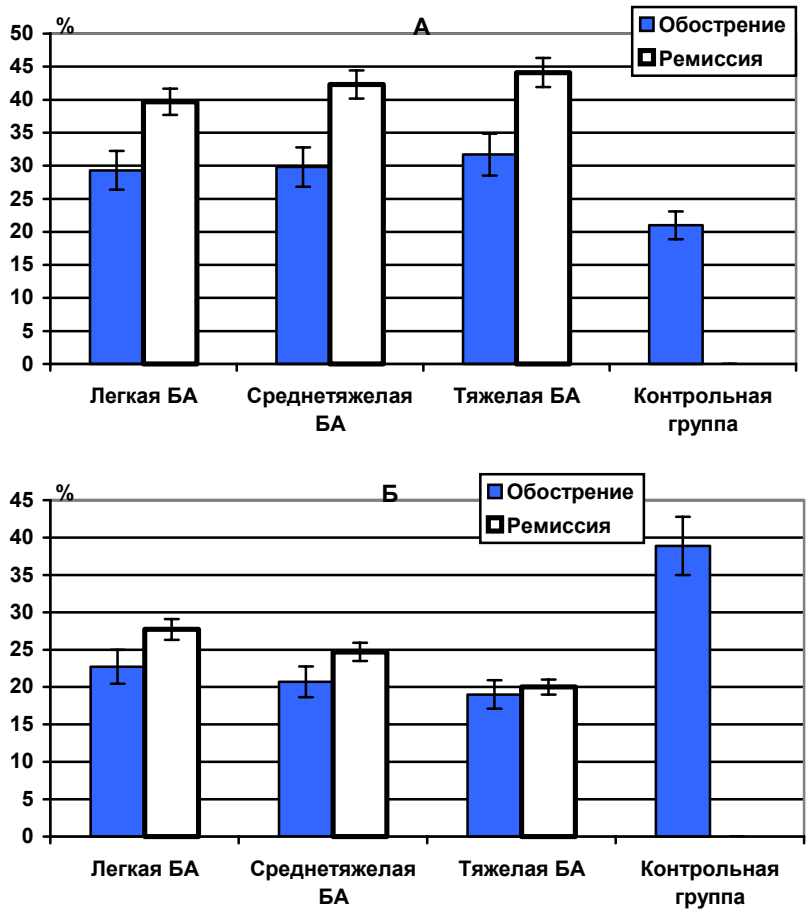

Рис. 10. ДНК-связывающая способность NF-kB (А) и p53 (Б) у пациентов с легкой, среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой до (обострение) и после (ремиссия) лечения

Интересно, что если экспрессия мРНК NF-kB у больных БА в период ремиссии снизилась, то ДНК-связывающая активность NF-kB в этот же период, напротив, увеличилась. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии прямой взаимосвязи между экспрессией мРНК NF-kB и его функциональной активностью в эозинофилах периферической крови больных БА. Данный факт подтверждает проведенный корреляционный анализ исследуемых показателей. Так, коэффициент корреляции Спирмена между экспрессией мРНК NF-kB и ДНК-связывающей способностью NF-kB у больных БА в период обострения составил r=0,27 (p=0,01), а в период ремиссии r=0,07 (p=0,48).

ДНК-связывающая способность транскрипционного фактора p53 у больных легкой, среднетяжелой и тяжелой БА в период обострения была существенно ниже значений в контроле. После лечения, несмотря на положительную динамику, в эозинофилах больных легкой, среднетяжелой и тяжелой БА ДНК-связывающая способность p53 оставалась статистически значимо ниже по сравнению с контрольными показателями (рис. 10Б).

Таким образом, в результате комплексной оценки экспрессии генов и функциональной активности транскрипционных факторов p53 и NF-kB установлено, что в период обострения у больных БА различной степени тяжести наблюдается увеличение экспрессии гена и функциональной активности фактора транскрипции NF-kB и снижение уровня мРНК и ДНК-связывающей способности транскрипционного фактора p53. В период ремиссии у больных БА регистриру-

ется некоторое снижение уровня мРНК нуклеарного фактора NF-kB, наряду с этим отмечается почти двухкратное повышение его ДНК-связывающей способности. Функциональная активность и уровень мРНК транскрипционного фактора p53 повысились в эозинофилах больных легкой и среднетяжелой БА. У больных тяжелой БА, напротив, наблюдалось снижение уровня мРНК p53 и отсутствие изменений в функциональной активности этого фактора. На фоне ИГКС терапии ни в одной из групп больных БА исследуемые параметры не достигли значений контроля.

Для оценки взаимосвязи между значениями $p21^{Waf1/Cip1}$, p53, NF-kB и ключевыми клинико-патогенетическими показателями, характеризующими тяжесть БА (активность апоптотической гибели эозинофилов, количество эозинофилов в ПК, уровень ИЛ-5 и ГМ-КСФ, ОФВ1, ПСВ, ПК20), был выполнен корреляционный анализ. В результате установлена высокая обратная корреляционная взаимосвязь между степенью тяжести заболевания и ДНК-связывающей активностью нуклеарного фактора p53 как в период обострения ($r=-0,56$, $p<0,001$), так и в ремиссию ($r=-0,84$, $p<0,001$).

Взаимосвязь экспрессии мРНК p53 с тяжестью заболевания также имела значимые коэффициенты корреляции Спирмена (обострение $r=-0,29$, $p=0,006$; ремиссия $r=-0,34$, $p<0,001$), однако данная зависимость носила нелинейный характер. Данный факт, возможно, связан с особенностями конформационной структуры белка p53 у больных БА и, соответственно, иными или новыми его внутриклеточными эффектами, в меньшей степени зависящими от экспрессии гена.

Показана значительная взаимосвязь экспрессии мРНК ГМ-КСФ с матричной активностью p53 у больных БА как в период обострения ($r= 0,87$, $p<0,001$) так и в ремиссию ($r=-0,51$, $p<0,001$). Однако следует обратить внимание, что если в период обострения данная зависимость была положительной, то после лечения ИГКС приобрела отрицательный характер.

Анализ корреляционных зависимостей между активностью NF-kB и ключевыми показателями, характеризующими тяжесть БА, продемонстрировал прямую положительную взаимосвязь активности фактора (экспрессия мРНК и ДНК-связывающая активность) и тяжести заболевания в период обострения ($r=0,59$, $p<0,001$; $r=0,27$, $p=0,009$, соответственно). Данная ассоциация вероятно реализуется путем влияния на функцию легких, с параметрами которой (ОФВ1, ПСВ и $ПК_{20}$) показатели экспрессии мРНК NF-kB продемонстрировали отрицательную корреляционную взаимосвязь в период обострения ($r= -0,46$, $p<0,001$; $r= -0,44$, $p<0,001$; $r= -0,25$, $p=0,01$, соответственно). Интересно отметить отсут-

ствие корреляции между активностью NF-kB (экспрессия мРНК и ДНК-связывающая активность) и экспрессией его транскрипционнозависимых генов-мишеней (ИЛ-5, ГМ-КСФ, BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2). Возможно этим объясняется и отсутствие взаимосвязи с показателями апоптоза эозинофилов.

Обнаруженная отрицательная взаимосвязь $p21^{Waf1/Cip1}$ с показателями апоптотической гибели эозинофилов, положительная корреляция с содержанием эозинофилов в периферической крови больных, с экспрессией мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-5, ГМ-КСФ и антиапоптотических эффекторов BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2 (обострение и ремиссия) доказывает важную роль $p21^{Waf1/Cip1}$ в реализации провоспалительных и антиапоптотических эффектов ИЛ-5 и ГМ-КСФ у больных бронхиальной астмой.

Заключение

По результатам проведенных исследований можно заключить, что в эозинофилах периферической крови больных БА увеличена активность антиапоптотических проксимальных эффекторов, способных ингибировать апоптоз как митохондриального так и рецепторного пути, и не изменена активность проапоптотических эффекторов.

Подобный дисбаланс в системе апоптоза может быть связан либо с генетическим дефектом в регуляторных и/или эффекторных генах, либо с особенностями коммитирования механизмов апоптоза на этапе дифференцировки эозинофилов.

Повышение апоптотической активности эозинофилов периферической крови больных легкой и среднетяжелой БА в период ремиссии на фоне существенного дисбаланса апоптотических факторов в сторону антиапоптотических эффекторов, по всей видимости, связан с глюкокортикостероид-опосредованным увеличением экспрессии BCLXS, BAX и снижением активности ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2). В свою очередь, повышение апоптотической гибели эозинофилов у больных тяжелой БА на фоне активации антиапоптотических эффекторов связано, вероятно, с высоким уровнем экспрессии апоптоз-активирующего фактора (AIF).

В условиях многофакторности механизмов воспалительного ответа важно разделять эффекторы, изменение активности которых является патогенетически важным, от эффекторов, которые являются сопутствующими основному процессу и косвенно связаны с реальным механизмом конкретного нарушения. В случае такой патологии как БА изменение в балансе про- и антиапоптотических

факторов в клетке и, в целом, снижение апоптотической активности, в частности эозинофилов, на наш взгляд является сопутствующим эффектом, отражающим более серьезную системную молекулярную патологию.

В настоящее время БА рассматривается как полиэтиологическое хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей с наследственной компонентой. БА может быть вызвана воздействием на организм аллергенов инфекционного происхождения (вирусы, микоплазмы, бактерии, грибы), атопической природы (пыльца растений, пыль, шерсть животных, пищевые продукты), а также химических, механических, физических и метеорологических факторов. Совершено очевидно, что при столь разнообразной природе этиологических факторов, имеющих совершенно различные молекулярные и физико-химические механизмы влияния на живые системы, но в конечном итоге приводящих к типичной при БА патоморфологической и клинической картине, в организме должна быть общая критическая мишень воздействия этих факторов.

На наш взгляд такой мишенью может быть транскрипционный фактор p53, контролирующий широкий спектр регуляторных и эффекторных генов через регуляцию транскрипции и прямое (белок-белковое) взаимодействие. При этом допустимо предположение, что у больных БА существует ряд незначительных генетических и, как следствие, функциональных дефектов как в самом гене p53, так и в генах регуляторной группы, которые при благоприятных условиях могут быть компенсированными.

Так, например, установленное нами снижение матричной и функциональной активности (возможно в результате мутации) транскрипционного фактора p53, может привести к сужению нормы реакции периферических контролируемых им функциональных систем, в частности к ослаблению контроля пролиферации, роста и дифференцировки клетки, к некомпетентности антиоксидантной системы в условиях оксидативного стресса и т.д.

Таким образом, наблюдаемые нами стабильные изменения в экспрессии апоптотических и апоптоз-ассоциированных генов у больных БА как до, так и после лечения являются следствием системной ошибки в регуляции клеточного ответа. Высокий базальный уровень экспрессии антиапоптотических эффекторов при низкой функциональной активности p53 и слабом, в ряде случаев неадекватном, ответе на ИГКС терапию (повышение ДНК-связывающей активности NF-kB) свидетельствует о том, что клетка находится в состоянии рефрактерности как к экстраклеточным так и внутриклеточным апоптотическим сигналам. Использование в терапии больных астмой ингаляционных глюкокортикостероидов, исключающее их прямое действие на эозинофилы периферике-

ской крови, предполагает, что наблюдаемые нами на фоне лечения изменения в значениях исследуемых параметров связаны с продукцией дистантных медиаторов воспаления.

Поскольку изменения в регуляторно-эффекторных механизмах апоптоза установлены нами в эозинофилах периферической крови, следовательно, формирование рефрактерного состояния происходит, по всей видимости, на этапе дифференцировки эозинофилов по механизму, схожему с формированием иммунной системы в эбриогенезе. Вероятно, в процессе деления, роста и особенно дифференцировки эозинофилов на фоне высокой оксидативной и цитокиновой нагрузки происходит селекция эозинофилов с высоким антиапоптотическим статусом эффекторного и регуляторного звена апоптоза. Возможно также, что подобный механизм селекции является общим для всех эффекторных клеток воспаления при БА. Необходимо отметить, что эффекты выявленных нами нарушений в системе внутриклеточной регуляции не ограничены исключительно механизмами апоптоза и могут иметь проявления во всех системах регуляции клеточного метаболизма.

Таким образом, в эозинофилах больных БА установлены серьезные нарушения в системе регуляции активности транскрипционных факторов NF-kB и p53 и, возможно, связанное с ними конститутивное доминирование экспрессии антиапоптотических эффекторов над проапоптотическими. Из полученных нами результатов также следует, что в эозинофилах больных БА, в первую очередь, нарушен (или изменен) механизм посттрансляционной функциональной активации транскрипционных факторов. Причиной посттрансляционной модификации активности факторов транскрипции может быть повышенная экспрессия $p21^{Waf1/Cip1}$. Высокий уровень $p21^{Waf1/Cip1}$ может быть причиной потери взаимосвязи между экспрессией гена p53 и его ДНК-связывающей способностью. Аналогичные эффекты $p21^{Waf1/Cip1}$ могут иметь место и в отношении фактора транскрипции NF-kB, а именно: увеличение ДНК-связывающей способности NF-kB на фоне снижения экспрессии его гена и экспрессии NF-kB–транскрипционно-зависимых генов. Системными последствиями посттрансляционной модификации активности p53 может стать ослабление контроля пролиферации, снижение репарации, снижение апоптоза, усиление неоангиогенеза и т.д. Модификация транскрипционной активности NF-kB может быть причиной неадекватного (гипер- или гипо-) иммунного ответа и развитие хронического воспаления.

Возможно установленные нарушения генетически детерминированы (компенсированные мутации в основных функциональных и регуляторных доменах)

или являются эффектом экзогенного (экстраклеточного) воздействия каких-либо факторов, например, повышения цитокиновой и/или оксидативной нагрузки. Не исключен вариант кооперативного проявления описанных выше механизмов. Из полученных данных следует, что формирование нарушений в системе регуляции активности транскрипционных факторов NF-kB, p53 и апоптотического статуса очевидно происходит в эозинофилах на этапе дифференцировки в костном мозге.

Выводы

1. Количество эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза значительно снижено при бронхиальной астме, независимо от тяжести заболевания, и ассоциировано с уровнем экспрессии мРНК ключевых факторов роста и дифференцировки эозинофилов (ГМ-КСФ и ИЛ-5). На фоне терапии ингаляционными глюкокортикостероидами уровень эозинофилов с признаками апоптоза повышается, достигая значений контроля при легкой и среднетяжелой астме, и оставаясь достоверно ниже контроля при тяжелой форме заболевания.

2. Уровень мРНК антиапоптотических (BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2) и проапоптотических (BAD, AIF) эффекторов повышен в эозинофилах периферической крови больных легкой и среднетяжелой бронхиальной астмой в период обострения. На фоне ингаляционной кортикостероидной терапии уровень мРНК BCL2, BFL1, BCLXL снижается, экспрессия генов ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2) достигает контроля, а проапоптотических генов BCLXS и BAX увеличивается при легкой и среднетяжелой астме. При обострении тяжелой астмы увеличена экспрессия всех антиапоптотических эффекторов (BCL2, BFL1, BCLXL, CIAP1, CIAP2) и снижена экспрессия гена BCLXS. Отличительной особенностью динамики данных показателей у больных тяжелой астмой на фоне лечения является сохранение высокого уровня экспрессии генов ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2) и увеличение экспрессии апоптоз-идуцирующего фактора AIF.

3. Экспрессия гена и ДНК-связывающая активность транскрипционного фактора p53 в эозинофилах периферической крови снижены при обострении бронхиальной астмы, повышаются в период ремиссии, не достигая контрольных значений.

4. Выявлена обратная корреляционная зависимость между тяжестью бронхиальной астмы и ДНК-связывающей активностью нуклеарного фактора

p53 как в период обострения, так и в ремиссию. Установлена сильная положительная корреляционная связь экспрессии p53 с матричной активностью BAX и BCLXS и отрицательная - с группой антиапоптотических эффекторов BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2 в период ремиссии бронхиальной астмы.

5. Экспрессия гена транскрипционного фактора NF-kB значительно повышена в эозинофилах больных бронхиальной астмой как в обострении так и в ремиссии. Ингаляционная глюкокортикостероидная терапия не сопровождается изменением экспрессии мРНК NF-kB, однако на ее фоне существенно увеличивается ДНК-связывающая способность NF-kB.

6. Проапоптотический механизм ингаляционной глюкокортикостероидной терапии у больных легкой и среднетяжелой бронхиальной астмой реализуется путем увеличения экспрессии BCLXS, BAX и снижения активности ингибиторов каспаз CIAP1, CIAP2, у больных тяжелой астмой - путем повышения экспрессии апоптоз-индуцирующего фактора AIF.

7. Экспрессия гена ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{Waf1/Cip1}$ повышена в эозинофилах больных бронхиальной астмой, независимо от тяжести и периода заболевания. Уровень мРНК $p21^{Waf1/Cip1}$ отрицательно коррелирует с количеством апоптотических эозинофилов, и положительно с уровнем эозинофилов периферической крови, с экспрессией мРНК ИЛ-5, ГМ-КСФ и антиапоптотическими эффекторами BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2 (обострение и ремиссия).

8. Механизм клеточной гибели эозинофилов у больных легкой и среднетяжелой бронхиальной астмой реализуется в период обострения через активацию апоптоз-индуцирующего фактора AIF, в период ремиссии за счет снижения экспрессии ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2). Особенностью тяжелой бронхиальной астмы является более значимое повышение экспрессии антиапоптотических эффекторов (BCLXL, BCL2, BFL1, CIAP1, CIAP2) в сравнении с легкой и среднетяжелой астмой, отсутствие нормализации экспрессии ингибиторов каспаз (CIAP1, CIAP2) и активация альтернативного пути апоптоза в период ремиссии.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Зависимость содержания клеток с цитогенетическими нарушениями и активности апоптотической гибели лейкоцитов периферической крови от уровня персистенции вируса Эпштейна-Барр // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Приложение 1. С. 63-65 (совместно Н.В. Иванова, А.Э. Сазонов, С.В. Рыжов, Т.М. Исаева).

2. Induction of lymphocyte apoptosis in peripheral blood of the patients with mammary and lung cancer in vitro and of activity of apoptosis of peripheral blood leukocytes disorders // Analytical cellular pathology. 2001, V.22, № 1,2. P.33-34/
3. Апоптотическая реакция лимфоидных клеток при инфекционном мононуклеозе// Бюллетень Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. 2001. №3.С. 100-102 (совместно В. В. Новицкий, О. И. Уразова, А.П. Помогаева, Л.С. Литвинова, О.А. Козич, И.О. Наследникова)
4. Продукция интерлейкина-5 (ИЛ-5) у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести // Сборник работ 68-й итоговой научной сессии КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного научного центра РАМН / Под ред. А.В. Завьялова, А.И. Конопли. В 2-х частях. Часть 1. – Курск: КГМУ. - 2002. - С. 96-97 (совместно с Копьевой А.П., Лещевой И.С., Сазоновым А.Э.).
5. Bcl-2 family mRNA and IL-5 mRNA expression in peripheral blood eosinophils of mild - to - moderate asthmatics // Functional Genomics – Boston, Massachusetts. – 2002. - P. 128 (совместно с A E Sazonov., Petrovsky F.I., Ageeva E.S).
6. Роль интерлейкина–5 в механизмах апоптотической гибели эозинофилов больных бронхиальной астмой // Бюллетень Сибирской медицины. - 2003. - № 2. - С. 38 – 41 (совместно с Сазоновым А.Э., Петровским Ф.И., Лещевой И.С., Копьевой А.П., Петровой И.В.).
7. 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 Е.С. Агеева М.А. Сорокина).
8. Экспрессия интерлейкина-5 в мокроте больных бронхиальной астмой // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2003. - Т.135. - № 4. - С. 437-440 (совместно с Петровским Ф.И., Сазоновым А.Э., Геренг Е.А., Огородовой Л.М.).
9. The particularity of eosinophils programmed cell death in bronchial asthma // Modern Methods in Cell Biology. – Heidelberg. – 2003. –P. 322. (совместно A E Sazonov, FI Petrovski, L M Ogorodova V V Novitskiy).
10. The role of IL-12 receptor in corticosteroid depended eosinophil apoptosis activation // The 6th World Congress on Inflammation Vancouver. – 2003. –P. 183. (совместно A E Sazonov, FI Petrovski, L M Ogorodova V V Novitskiy).
11. The particularity of eosinophils programmed cell death in bronchial asthma // International Congress of Biochemestry and Molecular Biology. – Toronto. –

Canada. -2003. P. 68. (совместно A E Sazonov, E S Ageeva, M V Sorokina FI Petrovski, L M Ogorodova V V Novitskiy).

12. Клиническая значимость определения интерлейкин-5 (IL-5) различными методами в сыворотке крови и мокроте больных бронхиальной астмой // Клиническая лабораторная диагностика. - 2004. - №4. - С. 38-41 (совместно с Огородовой Л.М., Сазоновым А.Э., Кобяковой О.С., Геренг Е.А., Копьевой А.П.).
13. 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 A Sazonov., Ageeva E.S., Petrovski F.I., Ogorodova L.M., Novitskiy V.V.).
14. Induced sputum free interleukin-5 level and its mRNA expression in atopic asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. – Vienna. - 2003. - P. 548 (совместно с A Sazonov., Kobyakova O.S., Ivanova U.V., Kopieva A.P., Lescheva I.S., Ogorodova L. M.).
15. Interleukin-12 receptor mRNA expression and corticosteroid depended eosinophil apoptosis in asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. – Vienna. – 2003. - P. 223 (совместно с Petrovski F.I., A Sazonov., Petrovskaia I.A., Ogorodova L.M.).
16. Клиническое значение исследования экспрессии гена IL-5 при бронхиальной астме. Пульмонология. – 2004. - №4. - С. 54-59 (совместно с Огородовой Л.М., Кобяковой О.С., Сазоновым А.Э., Петровским Ф.И., Лещевой И.С.).
17. Антагонистические эффекты изоформ рецептора интерлейкина 5 при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. – 2004. - № 1-2. - С. 121-126 (совместно с Сазоновым А.Э., Огородовой Л.М., Лещевой И.С., Копьевой А.П., Петровой И.В., Малышевым И.Ю.).
18. Влияние рекомбинантного интерлейкина - 5 на апоптотическую гибель эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2004. - № 1-2. - С. 117-120 (совместно с А.Э. Сазоновым, Огородовой Л.М., Лещевой И.С., Копьевой А.П., Петровой И.В., Малышевым И.Ю.).
19. 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 Поповой И.С., Агеевой Е.С., Петровой И.В., Сазоновым А.Э).

20. Эффекты рецептора интерлейкина 5 при бронхиальной астме // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ. – 2004. - С. 213-214. (совместно с Копьевой А.П., Сазоновым А.Э.., Поповой И.С.).
21. Linkage between NO synthases polymorphisms and asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. – Glasgow. - 2004. - P. 136 (совместно с Petrova I. V.,. A Sazonov., Deyev I.A., Ogorodova L.M.).
22. Activity of pro- and anti- apoptotic factors mRNA expression in eosinophils of asthmatics // European Respiratory Society. Annual Congress. – Glasgow. - 2004. - P. 321 (совместно с A Sazonov., Ageeva E. S., Petrova I. V., Ogorodova L. M.).
23. Роль нарушения регуляции апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме у детей // Сборник научных трудов по итогам IV межрегиональной научно - практической конференции "Здоровье детей - наше будущее!". – Томск. - 2004. - С. 82-96 (совместно с Сазоновым А.Э.., Деевым И.А., Никитиной Л.Ю., Агеевой И.П.).
24. Экспрессия мРНК интерлейкина-5, мембраносвязанной и растворимой формы α-субъединицы рецептора интерлейкина-5 в мокроте больных бронхиальной астмой // Физиология и патология иммунной системы. – 2004. – Т. 8. - № 6. - С. 29 – 31. (совместно с Огородовой Л.М., Кобяковой О.С., Копьевой А.П., Сазоновым А.Э., Лещевой И.С.)
25. Значение транскрипционного фактора p53 в механизмах апоптоза эозинофилов больных бронхиальной астмой // Сибирский медицинский журнал. – 2004. – Т. 19. - № 4. – С. 57 – 59. (совместно с Иванчуком И.И., Огородовой Л.М., Петровой И.В., Агеевой Е.С., Кармалитой Е.Г., Васьковскиим Н. В.)
26. Bcl-2 family mRNA and IL-5 mRNA expression in peripheral blood eosinophils of mild-to-moderate asthmatics // Medical Science Monitor. -2005. Т. 11. - №5. –P. 43-49. (совместно A Sazonov, F Petrovsky, E Ageeva, L Ogorodova, V. Novitsky, E. Manukhina, I. Malyshev).

Условные сокращения

БА – бронхиальная астма
ГАФД – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
ГКС - глюкокортикостероиды
ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ЕРО – пероксидаза эозинофилов (eosonophile peroxidase)
ECP – катионный протеин эозинофилов (eosinophile cationisches protein)
ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды
ИЛ – интерлейкин
ИФА – иммуноферментный анализ
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
$ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за первую секунду
ПК20 – концентрация метахолина, вызывающая падение $ОФВ_1$ на 20% и более
ПКГ – программируемая клеточная гибель
ПСВ – пиковая скорость выдоха
p300/CBP – кофактор транскрипции
P53 - транскрипционный фактор
РНК – рибонуклеиновая кислота

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предварительной реакцией обратной транскрипции (reverse transcription polymerase chain reaction)

ФНО-α - фактор некроза опухоли-α

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

АР – транскрипционный фактор

NF-kB - транскрипционный фактор kB

$p21^{Waf1/Cip1}$ - ингибитор циклинзависимых киназ