

2. Численность клещей *Ch. arcuatus* в пыли коррелирует с уровнем аллергенспецифических IgG4-антител у больных БА, проживающих в этих квартирах.
3. Выявление сенсибилизации к аллергенам *Ch. arcuatus* методами *in vivo* и *in vitro* у больных, постоянно контактирующих с этими клещами, свидетельствует о существенной роли *Ch. arcuatus* в формировании БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Студеникин М.Я., Балаболкин И.И. (ред.) Аллергические болезни у детей: Руководство для врачей М.: Медицина; 1998.
2. Гервазиева В.Б., Овсянникова И.Г., Воронкин Н.И. и др. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения аллергенспецифических IgE-антител // Журн. микробиол. 1987; 9: 33–35.
3. Гольшова Н.А. Диагностика аллергических заболеваний, вызванных сенсибилизацией к синантропным клещам: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1991.
4. Дубинина Е.В., Плетнев Б.Д. Методы обнаружения и определения клещей домашней пыли. Л.: Наука, 1977.
5. Дубинина Е.В., Плетнев Б.Д. Акарофауна пыли жилищ человека. В кн.: Паразитология. Л.; 1978; т.28: 37.
6. Желтикова Т.М. Синантропные клещи (*Acariformes: Pyroglyphidae, Acaridae, Glycyphagidae*) — источник бытовых аллергенов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 1998.
7. Назруллаева М.Ф. Клещи домашней пыли в условиях Узбекистана: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ташкент; 1990.
8. Петрова Т.И. Эпидемиологические и клинико-иммунологические особенности аллергических заболеваний у детей в Чувашии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2000.
9. Плетнев Б.Д., Дмитриева Н.П. Акарофауна домашней пыли у больных atopическим дерматитом. Вестн. дерматол. 1977; 2: 32–36.
10. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания. 3-е изд. М.: Трида-Х; 1999.
11. Фан Куанг Доан. Специфические аллергологические методы в диагностике клещевой бронхиальной астмы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1991.
12. Чучалин А.Г., Черняк Б.А., Буйнова С.Н., Тяренкова С.В. Распространенность и клинико-аллергологическая характеристика бронхиальной астмы в Восточной Сибири. Пульмонология 1999; 1: 42–49.
13. Asher M., Keil V., Anderson H. et al. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): Rationale and methods. Eur. Respir. J. 1995; 5: 483–491.
14. Burney P.J., Chinn S., Ronna P.J. Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the National Study of Health and Growth, 1973–1986. Br. Med. J. 1990; 300: 1306–1310.
15. Rosa A.E., Flechman C.H.W. Mites in house dust Brasil. Int. J. Acarol. 1979; 5 (3): 195–198.

Поступила 17.09.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.248–07:616.155.32–092.18

С.В.Бойчук, И.Г.Мустафин, Р.С.Фассахов, Л.Мбаинаджи

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Кафедра патофизиологии Казанского государственного медицинского университета;
Республиканский центр по борьбе со СПИДом МЗ РТ;
кафедра аллергологии Казанской государственной медицинской академии;
кафедра биохимии Казанского государственного университета

APOPTOSIS IN BLOOD LYMPHOCYTES IN ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

S.V.Boichuk, I.G.Mustafin, R.S.Fassakhov, L.Mbainaji

Summary

The present work shows results of investigation of spontaneous and induced apoptosis in blood lymphocytes (L) in healthy donors and atopic asthma (AA) patients. Apoptosis was assessed by several parameters: changes of the mitochondrial potential (MP) and of phosphatidylserine (PS) expression level on the outer leaflet plasma membrane, forward and side scatter parameters and DNA fragmentation using the flow cytometry. We obtained that the DNA fragmentation in the AA patients' L incubated in a culture became later and less than in the donors. The delayed DNA fragmentation did not depend on the Mn²⁺-DNAase activity. Spontaneous and induced reduction in the MP and increase in the PS expression were the earliest apoptosis markers which inversely interrelated and were observed even in optically intact cells. Changes of these parameters preceded the DNA fragmentation. There were no differences in the spontaneous changes of the MP and the PS levels between two study groups. Thus, the recognition of the apoptotic L in AA was not injured and a necessary factor for the apoptotic L elimination was their DNA fragmentation. The incubation of the donors' and AA patients' L with Ca²⁺ ionophore A23187 induced the similar changes of the MP and the PS expression and the DNA fragmentation. So, the spontaneous and induced types of apoptosis have common mechanisms

and are initiated with mitochondria involvement. The lymphocyte mitochondria are thought to be a universal integrator of apoptotic stimuli and the reduction in the MP is the earliest characteristic of the apoptosis inducing the following apoptotic features.

Резюме

В настоящей работе представлены результаты исследования механизмов спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов (Лф) периферической крови доноров и больных атопической бронхиальной астмой (АБА). Апоптоз оценивали в динамике по ряду параметров: изменению митохондриального потенциала (МП), уровня экспрессии фосфатидилсерина (ФС), параметров прямого и бокового светорассеивания, а также фрагментации ДНК методом проточной цитофлюорометрии. Показано, что в Лф больных АБА, инкубированных в среде, фрагментация ДНК наступает гораздо позднее и в меньшей степени по сравнению с Лф доноров. Отсроченная фрагментация ДНК в Лф больных АБА не обусловлена снижением активности Mn^{2+} -зависимых эндонуклеаз. Спонтанное и индуцированное различными факторами снижение МП Лф и появление ФС на их поверхности являются ранними признаками апоптоза, находятся в обратной зависимости друг от друга и наблюдаются даже среди клеток с неизменными показателями светорассеивания. Изменение данных показателей предшествует фрагментации ДНК Лф. Различий в спонтанном изменении величины МП и экспрессии ФС между двумя исследуемыми группами лиц не выявлено. Это свидетельствует о том, что распознавание Лф, подвергающихся апоптозу при АБА, может быть не нарушено, а фактором, необходимым для элиминации апоптотирующих Лф, является фрагментация их ДНК. Инкубация Лф доноров и больных АБА с ионофором Ca^{2+} A23187 индуцирует в той же последовательности аналогичные изменения МП, экспрессию ФС и фрагментацию ДНК. Таким образом, можно утверждать, что спонтанный и индуцированный ионофором Ca^{2+} апоптоз Лф имеет общие пути развития и начинается с вовлечения в данный процесс митохондрий. Следовательно, митохондрии Лф могут являться интегратором апоптогенных стимулов, а снижение величины их МП является самым ранним признаком апоптоза и индуцирует последующие проявления апоптоза.

Известно, что процессы программированной клеточной гибели (ПКГ), именуемые апоптозом, играют важную роль в поддержании гомеостаза организма [1]. В то же время нарушение регуляции процессов ПКГ может оказывать существенное влияние на патогенез многих заболеваний, в том числе и атопических, определяя их течение, прогноз и эффективность применяемой терапии.

ПКГ сопровождается изменением целого ряда морфологических, биохимических и других показателей клетки. Изменения, наблюдаемые в клетках, подвергающихся ПКГ, затрагивают практически все клеточные структуры: цитоплазму, органеллы, ядро и плазматическую мембрану.

Изменения в цитоплазме сопровождаются, в частности, дисбалансом ионного состава. В частности, повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} индуцирует апоптоз, в то время как внутриклеточное хелатирование данного иона предотвращает этот процесс. Считается доказанным, что ионы Ca^{2+} являются необходимыми для функционирования эндонуклеаз, вызывающих фрагментацию ДНК.

Важная роль в регуляции апоптоза принадлежит митохондриям. В них содержатся белки, присутствие которых является одним из необходимых факторов способствующих (*bcl-2*, *bcl-x* и др.) или препятствующих (*bcl-x_L*) запуску ПКГ. Помимо этого в данных органеллах содержится большое количество факторов (цитохром *c*, каспазы, апоптозиндуцирующий фактор и др.), принимающих участие в последовательной активации каспаз [7]. Более того, ряд этих факторов спосо-

бен самостоятельно вызывать деградацию ДНК, являющуюся, как известно, одним из основных критериев конечной и необратимой стадии апоптоза. Высвобождение вышеуказанных веществ из митохондрий происходит только после их "включения" в процесс апоптоза и сопровождается снижением трансмембранного митохондриального потенциала (МП).

Изменения в цитоплазматической мембране заключаются в появлении на поверхности апоптотирующих клеток в норме не экспрессирующихся специфических молекул (например, фосфатидилсерина — ФС и тромбосподина).

Описанные выше явления, наблюдаемые в клетках, подвергающихся ПКГ, безусловно, не происходят одновременно, однако до настоящего времени нет однозначной картины последовательности каскада реакций после запуска процесса ПКГ. В частности, не смотря на очевидную роль митохондрий в регуляции ПКГ, до сих пор остается дискуссионным обязательность их участия в апоптозе [6,8], а также первичность вовлечения в данный процесс [2,4,5,13,16]. Это, в частности, обусловлено наличием разнообразных индукторов апоптоза, каждый из которых имеет "свои" отличительные пути запуска процессов ПКГ, присутствием большого количества внутриклеточных регуляторов апоптоза, а также многообразием клеток и клеточных линий, на которых проводятся исследования, посвященные изучению данной проблемы.

Несмотря на достаточно большой объем исследований, посвященных изучению апоптоза, изучение разнообразных маркеров данного явления, их взаимосвя-

зи и роли в патогенезе atopических заболеваний, в том числе atopической бронхиальной астмы (АБА), по-прежнему представляет актуальную задачу.

Известно, что одним из главных звеньев патогенеза АБА является инфильтрация бронхиального дерева клетками, ответственными за развитие хронического воспаления, приводящего к длительной обструкции дыхательных путей и определяющих хронический характер течения заболевания. К вышеуказанным клеткам относятся в первую очередь лимфоциты (Лф) и эозинофилы, представляющие собой соответственно регуляторное и эффекторное звено развивающегося в легких воспаления.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение механизмов и последовательности событий спонтанного и индуцированного апоптоза Лф периферической крови доноров и больных АБА, а также выявление возможных нарушений в регуляции их ПКГ.

Методика исследований

Объектом исследований явились клетки периферической крови 20 здоровых доноров и 20 больных АБА легкой и средней степени тяжести течения заболевания. Лф выделяли центрифугированием на градиенте плотности перколла ("Pharmacia") с предварительным осаждением эритроцитов 4,5% раствором декстрана Т-500 ("Loba Chemie"). Клетки, выделенные с интерфазы 1,077, культивировали в 96-луночных пластиковых плоскодонных планшетах ("Nung") в среде RPMI 1640 ("Flow") с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мкг/мл L-глутамин ("Flow"). Клетки инкубировали с ионофором Ca^{2+} A23187 ("Sigma") (1–5 мкМ), m-ClCCCP ("Sigma") (50–150 мкМ). Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 1–6 сут.

Апоптоз Лф оценивали методом проточной цитофлуориметрии на приборе Facscan ("Becton Dickinson") по следующим параметрам.

1. Оценка изменений в ядре проводилась с использованием красителя пропидия йодида (PI) ("Sigma") [11]. Клетки фиксировали в течение 1 ч 70° этиловым спиртом, затем отмывали фосфатным буфером и окрашивали на ДНК при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте гипотоническим раствором PI, содержащим 0,1% тритона X-100 и 0,1% цитрата натрия. Подсчитывали процент клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне гистограммы (M2), располагающейся левее основного пика (M3), соответствующего диплоидным клеткам. Известно, что в гиподиплоидной зоне локализуются клетки, подвергшиеся апоптозу. В ряде случаев наблюдали пик, располагавшийся правее основного (диплоидного) пика, определяемый как тетраплоидный (M4). Данный пик рассматривали как показатель пролиферативной активности клеток. Гистограммы, полученные при проточной цитометрии с использованием данного метода, приведены на рис.1 (гиподиплоид-

ный, диплоидный и тетрадиплоидный пики обозначены соответственно как M2, M3, M4). Пик M1 располагался левее пика M2 и соответствовал клеткам, подвергшимся некротической гибели.

2. Изменение величины митохондриального потенциала (МП) измеряли с помощью флюорохромов CMX-ROS ("Molecular Probes"), и DiOC₆ ("Sigma") [4]. К 30 мкл маточного раствора CMX-ROS добавляли 60 мкл фосфатно-солевого буфера и тщательно перемешивали. Полученный раствор добавляли по 5 мкл в клеточную суспензию. Концентрация клеток составляла 1 000 000 кл/мл. К 150 мкл клеточной суспензии также добавляли 7,5 мкл рабочего раствора DiOC₆. Клетки с флюорохромами инкубировали в течение 30 мин при 37°C в темноте и анализировали на проточном цитофлуориметре (рис.2,а). Регистрацию величины МП клеток с помощью DiOC₆ и CMX-ROS проводили при возбуждении аргон-неоновым лазером 488 нм (мощность тока 15 мВ) по FL1 и FL3 соответственно.

В отдельных экспериментах клетки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре с m-ClCCCP ("Sigma") в концентрации 50 мк/моль. Данное вещество является специфическим индуктором, снижающим величину МП (рис.2,б).

3. Оценка изменений клеточной мембраны (а именно уровня экспрессии ФС) проводили с помощью флюорохрома MC540. Маточный раствор MC540 (концентрация 1 мг/мл) в объеме 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 10⁶ кл/мл (конечная концентрация MC540 5 мкг/мл). Регистрацию результатов проводили сразу после внесения флюорохрома в клеточную среду при возбуждении аргон-неоновым лазером 488 нм (мощность тока 15 мВ) по FL2 [4].

4. Оценка параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) рассеивания.

5. Для исследования активности ДНКаз предварительно получали плазмидную ДНК, предварительно очищенную от РНК методом гель-фильтрации. Выделение и очистку ДНК плазмиды pBR322 из клеток *E.coli* осуществляли после амплификации, используя

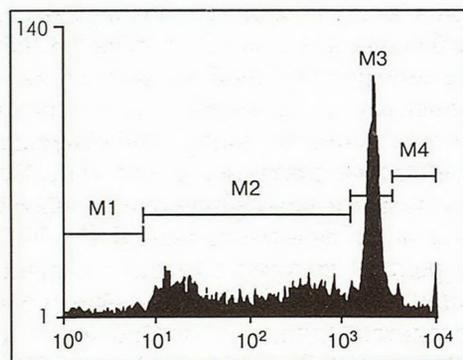


Рис.1. Цитофлуориметрический анализ ДНК Лф по окрашиванию PI.

По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции клеток (в усл.ед.); по оси ординат — число клеток с данным уровнем флуоресценции. M1 — некротические клетки, M2 — гиподиплоидные клетки, M3 — диплоидные клетки, M4 — тетраплоидные клетки.

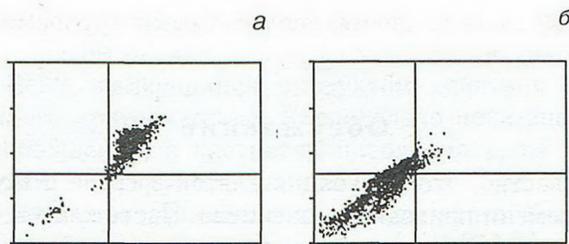


Рис.2. Цитофлюорограмма, иллюстрирующая величину МП свежeweделенных Лф.

По оси абсцисс — уровень флюоресценции клеток по CMX-ROS; по оси ординат — уровень флюоресценции клеток по DiOC₆. а — контроль; б — уровень флюоресценции клеток после их инкубации с m-CLCCP в течение 15 мин.

метод щелочной экстракции без ультрацентрифугирования. Исследование активности ДНКаз осуществлялось методом электрофореза в 0,7% агарозном геле по стандартной методике и флюорометрически с использованием этидиума бромида.

Результаты исследований

Инкубация Лф доноров и больных АБА в среде с течением времени индуцировала изменения как в цитоплазме и ядре, так и клеточной поверхности. В частности, уменьшение величины МП наблюдалось после 48-часовой инкубации клеток в среде. Одновременно с этим происходило увеличение уровня флюоресценции МС540, что свидетельствовало о появлении экспрессии ФС на клеточной поверхности. В дальнейшем (72 и 96 ч) происходило изменение показателей светорассеивания Лф, сопровождаемое дальнейшим снижением величины МП и повышением уровня экспрессии ФС. В эти же сроки (72 и 96 ч) происходила фрагментация ДНК (рис.3).

Синхронное изменение величины МП и уровня экспрессии ФС у Лф позволило нам предположить, что эти процессы взаимосвязаны и находятся в обратной зависимости друг от друга. Данное предположение подтвердилось при одновременном окрашивании Лф с использованием двух флюорохромов для

оценки величины МП и экспрессии ФС. Показано, что экспрессия ФС происходит лишь на клетках со сниженным МП, в то время как Лф с неизменной величиной МП не экспрессируют ФС на своей поверхности. Аналогичные результаты были получены при инкубации Лф с m-CLCCP.

Показано, что инкубация Лф с m-CLCCP (50–150 мкМ) дозозависимо снижает величину МП уже спустя 30 мин инкубации. Экспрессия ФС на поверхности Лф после их инкубации с m-CLCCP начинает проявляться спустя 24 ч. С течением времени обнаруживается четкая обратная зависимость между уровнем экспрессии ФС и величиной МП.

Таким образом, снижение МП у Лф предшествует экспрессии ФС на их клеточной мембране, а "принудительное" снижение величины МП способствует появлению ФС на поверхности Лф.

Различий в изменении этих двух параметров между Лф доноров и больных АБА не было выявлено.

В предыдущих исследованиях [9,10] было показано, что фрагментация ДНК у Лф больных АБА происходит в меньшей степени и на более поздних сроках инкубации по сравнению с Лф доноров. Тем не менее другими исследователями существенных различий в уровне спонтанного апоптоза, оцениваемого по количеству гиподиплоидных Лф между группой здоровых лиц и больных БА, не было выявлено [1].

При инкубации Лф доноров и больных АБА в среде было показано, что процент гиподиплоидных клеток среди Лф больных АБА превышает таковые значения Лф здоровых лиц. Различие в исследуемом показателе обнаруживалось после 96-часовой инкубации. При инкубации клеток в течение 120 ч и более различие в данном показателе было более существенным.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что у Лф больных АБА при инкубации в среде с течением времени фрагментация ДНК происходит в меньшей степени по сравнению с Лф доноров.

Среди возможных причин "отсроченной" фрагментации ДНК у Лф больных АБА может быть изменение активности эндонуклеаз, в частности Мп-зависимых. О наличии активности данного фермента судили по времени получения разрывов ДНК плазмиды pBR322.

Нами было показано, что время получения разрывов кольцевой ДНК плазмиды pBR322 при ее инкубации с белками, выделенными из Лф больных АБА, существенно не отличается от контроля (рис.4). Более того, в некоторых случаях ДНКазная Лф больных АБА превышала аналогичную активность Лф доноров.

Таким образом, можно говорить, что активность Мп-зависимых ДНКаз у Лф больных АБА не нарушена и "отсроченная" фрагментация ДНК Лф больных АБА не может быть обусловлена изменением активности данного фермента.

Результаты исследований механизмов спонтанного апоптоза свидетельствуют, что снижение МП Лф является самым ранним признаком ПКГ, предшествую-

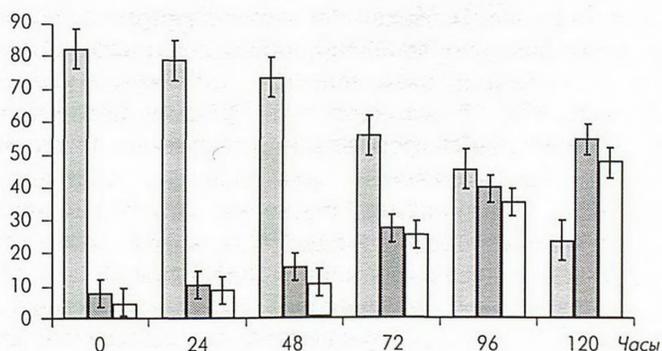


Рис.3. Зависимость экспрессии ФС и фрагментации ДНК от величины МП Лф.

По оси абсцисс — время инкубации; по оси ординат — количество клеток.

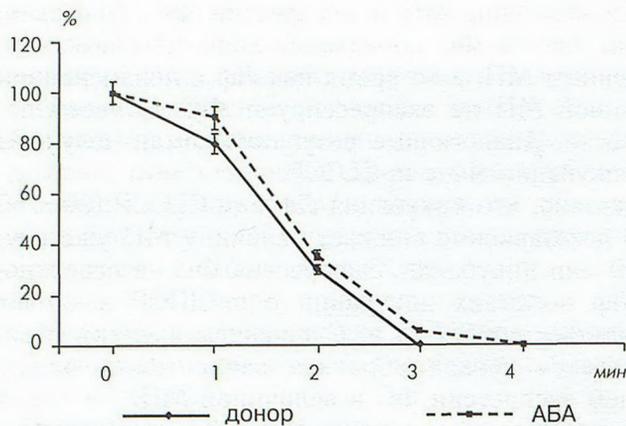


Рис. 4. Кинетика гидролиза ДНК плазмиды pBR 322 (масштаб полулогарифмический).

По оси абсцисс — время инкубации; по оси ординат — количество кольцевых молекул ДНК.

щим изменению клеточного объема, экспрессии ФС и фрагментации ДНК. Изменение величины МП может наблюдаться в "оптически интактных" клетках и индуцирует экспрессию ФС на клеточной поверхности. В то же время фрагментация ДНК Лф происходит в последнюю очередь, сопровождается изменением клеточного объема и наблюдается преимущественно среди клеток с измененными "оптическими характеристиками" и, вероятно, наблюдается в клетках со сниженной величиной МП. Одновременно исследовать эти два показателя не представляется возможным, так как процедура фиксации клеток, необходимая для окрашивания их ДНК, сама способна изменить величину МП. Тем не менее, учитывая факт, что, с одной стороны, изменение величины МП происходит даже среди клеток с "нормальными" показателями светорассеивания, а их дальнейшее изменение сопровождается последующим снижением МП, и, с другой стороны, что фрагментация ДНК Лф наблюдается в оптически измененных клетках, можно также говорить о тесной взаимосвязи вышеуказанных событий.

Полученные нами данные имели сходную картину при инкубации Лф с ионофором кальция A23187 (1–5 мкМ). В частности, инкубация Лф с A23187 в первую очередь дозозависимо снижала величину их МП. Высокие дозы препарата (5 мкМ) приводили к снижению данного показателя уже через 30 мин инкубации, в то время как инкубация Лф с ионофором в концентрациях 1 и 2 мкМ индуцировала аналогичные изменения через 24 ч. Экспрессия ФС на поверхности Лф при индуцированном ионофором кальция апоптозе происходила во всех случаях после снижения величины МП и находилась в обратной зависимости от данного показателя. В дальнейшем происходило изменение показателей FSC и SSC, сопровождаемое фрагментацией ДНК Лф.

Таким образом, повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} индуцирует процессы ПКГ у Лф. Различий в динамике и последовательности событий, разворачивающихся в Лф после их инкубации с ионофором

A23187, между двумя исследуемыми группами лиц не выявлено.

Обсуждение

Известно, что инкубация клеток в среде с течением времени приводит к их гибели. Часть клеток (иногда значительная) гибнет по типу некроза, другие клетки погибают посредством запуска процессов ПКГ, обусловленного, в частности, отсутствием факторов роста. Это подтверждается тем, что добавление в культуральную среду факторов роста и колониестимулирующих факторов (ИЛ-2, ГМ-КСФ и др.) существенно продлевает срок жизни культивируемых Лф.

Полученные в ходе проведенных исследований результаты показывают, что Лф больных АБА обладают устойчивостью к запуску программы ПКГ. Об этом свидетельствует "отсроченная" фрагментация их ДНК по сравнению с Лф доноров. Полученные нами данные коррелируют с данными других исследователей, изучавших процессы спонтанного и индуцированного апоптоза в периферической крови БА и доноров [9,10]. Каковы причины данного явления? Некоторыми исследователями показано, что фрагментация ДНК происходит гораздо быстрее у клеток со сниженной величиной МП [16]. Однако работы других исследователей показывают интактность митохондрий во время фрагментации ДНК [5] и отрицают обязательность участия данных органелл в апоптозе, указывая на существование как минимум двух путей деградации ДНК — митохондриозависимого и митохондриезависимого [6,8]. Известно, что в митохондриях локализовано большое количество биологически активных веществ, обладающих способностью самостоятельно или опосредованно запускать каскад реакций, приводящих в конечном счете к деградации ядра посредством действия каспаз и эндонуклеаз. К этим веществам следует отнести: а) апоптозиндуцирующий фактор (АИФ), способный (несмотря на отсутствие ДНКазной активности) *in vitro* самостоятельно (без участия дополнительных факторов цитоплазмы) вызывать апоптотические изменения ядра в течение короткого интервала времени (<15 мин). Механизм апоптогенного действия данного фактора, вероятно, обусловлен его способностью потенцировать действие протеаз на клеточное ядро [7]; б) цитохром *c* — фактор, который (в отличие от АИФ) требует присутствия дополнительных цитоплазматических факторов для фрагментации ядра [7]; в) керамид, также индуцирующий апоптотические изменения в ядре. Однако для этого ему требуется большой временной интервал (>3 ч) [7]; г) каспазы 2 и 9, обладающие ДНКазной активностью [14]. До недавнего времени считалось, что выброс данных веществ в цитоплазму клеток осуществляется через митохондриальную мембрану после изменения (снижения) трансмембранного потенциала митохондрий, а следовательно и высвобожде-

ние из них биологически активных веществ, регулируется рядом белков, одним из которых является белок Bcl-2, являющийся продуктом действия одноименного протоонкогена. Убедительно показано, что высвобождение, в частности цитохрома *c*, из митохондрий блокируется данным белком [15]. Также показано, что уровень экспрессии этого белка в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), полученного у больных АБА, коррелирует с клинической картиной заболевания и существенно возрастает у лиц со среднетяжелым и тяжелым течением АБА. В то же время у доноров и лиц с легким течением АБА экспрессия данного белка на клетках БАЛ находится на одинаковом уровне [12]. Следовательно, можно предположить, что инфильтрация легких клетками периферической крови и последующее нарушение их элиминации из тканей может быть обусловлена дефектом выброса из митохондрий активных веществ, способствующих апоптозу клеток.

Таким образом, изучение динамики изменения величины МП позволило бы определить локализацию возможного дефекта, лежащего в основе "отсроченной" фрагментации ДНК у Лф больных АБА, и подтвердить выдвинутое нами предположение. С этой целью нами были предприняты исследования величины МП у Лф доноров и больных АБА.

Выявлено, что снижение величины МП предшествует фрагментации ДНК, что доказывает первичность вовлечения митохондрий в процесс ПКГ. Тем не менее полученные результаты также показывают, что при инкубации клеток в среде количество Лф с неизменным МП у доноров и больных уменьшалось со временем в одинаковой степени. Аналогичные результаты получены при индукции апоптоза с помощью ионофора Ca^{2+} A23187. Полученные нами результаты позволяют сделать ряд предположений:

1) возможной причиной "отсроченной" фрагментации ДНК Лф является не нарушение выхода биологически активных веществ из митохондрий в цитоплазму, а нарушения активности данных биологически активных веществ. Учитывая широкий спектр биологически активных веществ, на данный момент нельзя сказать, дефект активности какого из них лежит в основе затруднения фрагментации ДНК;

2) выход некоторых биологически активных веществ из митохондрий происходит все же независимо от величины МП. Подтверждением этой гипотезы служит, например, опубликованные недавно результаты исследований, свидетельствующие о том, что выброс цитохрома *c* из митохондрий не зависит от величины МП и может даже предшествовать снижению величины МП [3];

3) в цитоплазме Лф больных АБА имеется факторы, блокирующие активность биологически активных веществ, выделяющихся из митохондрий;

4) фрагментация ДНК Лф может происходить автономно, т.е. без участия митохондрий, а одновременное снижение величины МП и процесс фрагментации ДНК Лф являются параллельными процессами,

не связанными друг с другом. Следовательно, основу "отсроченной" фрагментации ДНК Лф больных АБА могут составлять дефекты активности многочисленной группы ДНКаз.

Изучение активности Мп-зависимой ДНКазы показало, что активность данного фермента у Лф больных АБА не нарушена. Проведенные ранее исследования нейтральной Мп-зависимой ДНКазы хроматина показали, что этот фермент широко представлен во всех структурах хроматина как в области нуклеосом, так и в линкерных участках ДНК. Устойчивость ДНК хромосом к действию ДНКазы объясняется ее способностью гидролизовать только денатурированные участки ДНК.

В свете этих данных одинаковая активность данного фермента у Лф здоровых и больных АБА не является достаточным основанием для исключения участия Мп-зависимой ДНКазы хроматина в фрагментации ДНК при апоптозе. Вполне обоснованно можно сделать предположение, что при АБА происходят изменения в составе ДНК-связывающих белков хроматина, что делает ДНК более устойчивой к действию ядерных ДНКаз. Выяснение этого предположения является одной из задач дальнейших исследований.

Более того, существует большое количество иных ферментов, обладающих способностью расщеплять ДНК. Поэтому, безусловно, представляет интерес в дальнейшем изучение активности у Лф других типов ДНКаз, в частности Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимых.

Известно, что распознавание клеток, подвергшихся апоптозу, и их последующая элиминация происходят, в частности, через появившиеся на клеточной поверхности "апоптотизируемых клеток" новые молекулы (ФС, тромбоспондин и др.), в норме не экспрессирующихся на наружной поверхности.

Следовательно, у Лф больных АБА можно было ожидать нарушения экспрессии ФС на наружной клеточной мембране. Тем не менее сравнительный анализ динамики экспрессии ФС на поверхности Лф доноров и АБА не выявил между ними существенных различий. Также было показано, что изменение данного параметра апоптоза находится в четкой обратной зависимости от величины МП и происходит только после ее спонтанного и индуцированного (С1ССР, ионофор Ca^{2+} A23187) снижения.

Несмотря на отсутствие различий в спонтанном изменении величины МП и уровня экспрессии ФС между Лф доноров и больных АБА, было показано, что у Лф больных АБА фрагментация ДНК, являющаяся конечной и необратимой фазой апоптоза, происходит в меньшей степени.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об устойчивости Лф больных АБА к процессу ПКГ. Митохондрии вовлекаются в данный процесс на ранних сроках апоптоза, и изменение величины МП является его ранним признаком. Экспрессия ФС на поверхности Лф находится в тесной обратной взаимосвязи с величиной их МП. Сущест-

венной разницы в экспрессии ФС на поверхности Лф больных АБА и доноров не обнаружено. Это позволяет говорить о том, что распознавание Лф, подвергающихся апоптозу при АБА, может быть и не нарушенным. Тем не менее для элиминации данных клеток из органов-мишеней необходима, по-видимому, деграция их ДНК. Для ответа на вышеуказанные предположения требуются дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А. и др. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки в клинико-иммунологическом обследовании больных. Мед. иммунол. 2000; 2 (1): 7–16.
2. Banki K., Hutter E., Gonchoroff N., Perl A. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. J. Exp. Med. 1995; 182: 367–377.
3. Castedo M., Hirsch T., Susin S. et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. J. Immunol. 1996; 157: 512–521.
4. Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassilli E. et al. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. Exp. Cell Research. 1994; 214: 323–330.
5. Jacobson M.D., Burne M.P., King T. et al. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Nature 1993; 361: 365–369.
6. Kroemer G., Zamzani N., Susin S. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol. Today. 1997; 18 (1): 44–51.
7. MacDonald G., Shi L., Vande Velde C. et al. Mitochondria-dependent and independent regulation of granzyme B-induced apoptosis. J. Exp. Med. 1999; 189: 131–143.
8. Melis M., Siena A., Vignola A., ed. Effects of zafirlukast on peripheral-blood-lymphocyte (PBL) apoptosis in asthma. In: Abstracts of European Respiratory Society. Annual Congress. Berlin; 1997. 25.
9. Melis M., Siena A., Vignola A., ed. Fluticasone propionate induces apoptosis in on peripheral-blood-lymphocyte (PBL) isolated from normal and asthmatic patients. Ibid. 31.
10. Nicoletti I., Migliorati G. Rapid and simple method of measurement of nuclear apoptosis. J. Immunol. Meth. 1991; 139: 271–279.
11. Panagou P., Karameris S., Tspira S. et al. BCL-2 expression in asthma: Analysis of sputum induction samples. In: Abstracts of European Respiratory Society. Annual Congress. Berlin; 1997.— 38.
12. Petit P.X., LeCocuer H., Zorn E. et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexametasone-induced thymocyte apoptosis. J. Cell Biol. 1995; 130: 157–167.
13. Susin S., Lorenzo H., Zamzani N. et al. Mitochondrial release of caspase-2 and caspase-9 during the apoptotic process. J. Exp. Med. 1999; 189: 381–393.
14. Yang J., Bhalla K., Kim C.N., ed. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997; 275: 1129.
15. Zamzani N., Marchetti P., Castedo M. et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med. 1995; 181: 1661–1672.

Поступила 03.05.01

© ПИСКУНОВ Г.З., ШИРШОВА А.А., 2003

УДК [616.216-002.28-06:616.248]-089

Г.З.Пискунов, А.А.Ширшова

ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПОЛИПОЗНОГО ПОЛИСИНУСИТА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И АСПИРИНОВОЙ ТРИАДОЙ

Учебно-научный центр Медицинского центра Управления делами Президента РФ, Москва

SURGICAL TREATMENT OF POLYPOUS POLYSINUSITIS IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

G.Z.Piskunov, A.A.Shirshova

Summary

We observed 302 patients with polyposis polysinusitis combined with bronchial asthma and/or aspirin intolerance. They underwent endoscopic polysinusotomy. To prevent exacerbations of the pulmonary pathology and polyposis relapses all the patients were divided into 3 groups. The 1st group (146 patients) received corticosteroids before and after the operation. The 2nd group (133 patients) was given the same therapy before and after the operation and they were treated with topic corticosteroids in postoperative period not less than 6 months. The 3rd group (23 patients) received 3 plasmapheresis procedures each before the operation and topic corticosteroids for long time. As a result, there were no exacerbations of the lower airway pathology at the early postoperative period and all the patients came through the operation well. The polyposis relapses in the 1st group became quite early: for 3 yrs they have been diagnosed in 96.9% of the patients. In the 2nd group the polyposis relapses have been become for 3 yrs in 30.1% of the patients. The 3rd group patients have not had the polyposis relapses during this period.