

УДК 616.155.32-091.818:616.248

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ
РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИС.В.Чубарова¹, И.А.Чернова², А.Ю.Крапошина¹, И.А.Соловьева¹, И.В.Демко¹,
А.Б.Салмина¹, Н.А.Малиновская¹¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Министерства
здравоохранения РФ, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН,
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить особенности реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных бронхиальной астмой (БА) различной степени тяжести в периоде обострения и вне его. Обследовано 136 больных, которые в зависимости от степени тяжести заболевания были разделены на 2 группы. В первую группу были включены 67 пациентов с БА среднетяжелого течения, во вторую группу – 69 больных астмой тяжелого течения, среди которых 31 пациент постоянно принимал системные глюкокортикостероиды. Исследовали спонтанный и дексаметазон-индуцированный апоптоз лимфоцитов периферической крови, а также влияние блокатора кальциевых каналов на модулятор-индуцированную программируемую клеточную гибель в период обострения заболевания и вне его. Установлено, что при БА дексаметазон-индуцированный апоптоз имеет некоторые особенности. Выявлено усиление модулятор-индуцированного апоптоза при БА различной степени тяжести в условиях *in vitro*. Однако тяжелое течение заболевания характеризуется снижением апоптотической активности лимфоцитов, что свидетельствует о персистенции воспаления в дыхательных путях и усилении выживаемости иммунокомпетентных клеток. Таким образом, наличие длительно существующих иммунокомпетентных клеток в дыхательных путях обусловлено не только их повышенной миграцией в ткани, но и замедлением элиминации клеток вследствие нарушения процессов программируемой клеточной гибели, что более четко прослеживается с утяжелением заболевания. Выявлено, что подавление механизма поступления кальция в клетки через кальциевые каналы L-типа цитоплазматической мембраны лимфоцитов не оказывает влияния на апоптоз-индуцирующее действие дексаметазона *in vitro*. Установлено, что антиапоптотическое действие блокатора кальциевых каналов полностью утрачивается в периоде обострения БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, апоптоз, глюкокортикостероиды.

SUMMARY

APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCYTES AT BRONCHIAL ASTHMA OF
A DIFFERENT SEVERITY DEGREES.V.Chubarova¹, I.A.Chernova², A.Yu.Kraposhina¹,
I.A.Solov'eva¹, I.V.Demko¹, A.B.Salmina¹,
N.A.Malinovskaya¹¹Krasnoyarsk State Medical University, 1 Partizana
Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022,
Russian Federation²Research Institute of Medical Problems of the North of
Siberian Branch RAMS, 3g Partizana Zheleznyaka Str.,
Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

Research objective: to study the features of realization of apoptosis of lymphocytes in the peripheral blood in patients with bronchial asthma of different severity in the period of exacerbation and out of it. 136 patients were divided into 2 groups depending on the severity of the disease. In the first group 67 patients with moderate bronchial asthma were included; the second group consisted of 69 patients with severe bronchial asthma among whom 31 patients constantly took systemic glucocorticosteroids. Spontaneous and Dexamethasone-induced apoptosis of lymphocytes in peripheral blood as well as the influence of the blocker of calcium channels on the modulator-induced programmable cellular death in the period of exacerbation of the disease and out of it were studied. It was found out that at bronchial asthma Dexamethasone-induced apoptosis has some features. The intensification of modulator-induced apoptosis at bronchial asthma of different severity in the conditions *in vitro* was revealed. But the serious course of the disease is characterized by the depression of apoptotic activity in lymphocytes, which proves an inflammation persistence in respiratory tracts and the intensification of immunocompetent cells survival. Thus, the existence of long existing immunocompetent cells in respiratory tracts is caused not only by their increased migration in the tissue, but also by the retardation of cells elimination owing to the disturbance of the processes of programmable cellular death, which is more accurately traced with the disease severity. It was found out that the suppression of the mechanism of calcium entering the cells via calcium channels of L-type of lymphocytes cytoplasmatic membrane has no impact on apoptosis-inducing effect of *in vitro* Dexamethasone. It was established that anti-apoptotic action of calcium channels blocker is completely lost in the period of bronchial asthma exacerbation.

Key words: bronchial asthma, apoptosis, glucocorticosteroids.

Бронхиальная астма (БА) представляет собой серьезную проблему во всем мире, каждый год астма уносит жизни около 250 тысяч человек. БА – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и клеточные элементы [4]. Вне зависимости от степени тяжести астмы воспаление в дыхательных путях является персистирующим. Важная роль в процессе воспаления принадлежит апоптозу. Персистенция воспаления в дыхательных путях при БА осуществляется за счет усиления выживаемости Т-лимфоцитов и потери их способности к программируемой клеточной гибели, что приводит к накоплению в зоне воспаления мононуклеарных клеток, в том числе лимфоцитов [2, 10]. Результаты исследования некоторых авторов свидетельствуют о наличии обратной связи между количеством апоптотических клеток и тяжестью астмы [11], также известно, что при БА фрагментация ДНК лимфоцитов – конечная и необратимая стадия апоптоза – наступает значительно позже.

Известно, что важным механизмом индукции апоптоза лимфоцитов под действием глюкокортикостероидов (ГКС) является значительное и неконтролируемое увеличение уровня кальция в цитозоле клеток в результате его массивного высвобождения из внутриклеточных депо или поступления в цитозоль через потенциал-зависимые кальциевые каналы цитоплазматической мембраны. [3]. Перегрузка митохондрий ионами кальция приводит к набуханию последних и разрыву наружной мембраны, вследствие чего в цитозоль поступают проапоптотические вещества [9], приводящие к запуску апоптоза. Вместе с тем, имеются данные о том, что при обострении БА наблюдается усиление апоптоза лимфоцитов индуцированной мокроты, и этот эффект нивелируется в период ремиссии болезни [1].

Th2-лимфоциты экспрессируют L-тип кальциевых каналов, эффективно блокируемых верапамилом. Появились работы, демонстрирующие терапевтическую эффективность верапамила при БА в контексте подавления воспаления [7], поэтому вероятным является предположение о влиянии блокаторов L-типа кальциевых каналов на чувствительность иммунокомпетентных клеток к апоптозу, индуцированному ГКС. Таким образом, тонкие механизмы индукции апоптоза в иммунокомпетентных клетках при БА мало известны.

Цель исследования – изучить особенности реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных БА среднетяжелого и тяжелого течения в период обострения и вне его.

Материалы и методы исследования

В данной работе оценивался апоптотический индекс лимфоцитов периферической крови у больных БА среднетяжелого и тяжелого течения в различные фазы заболевания в условиях *in vitro*. Проводилась регистрация спонтанного и модулятор-индуцированного апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Всего в исследовании принимали участие 136 человек в возрасте от 18 до 70 лет, в том числе 101

(74±3,75%) женщина и 35 (26±3,75%) мужчин, средний возраст по медиане составил 49 [34;54] лет, давность заболевания – 8,5 [2;15] лет. Среди всех больных аллергическая астма регистрировалась у 84 (61,76±4,17%) пациентов, неаллергическая БА – у 52 (38,24±4,17%) человек. У всех респондентов астма была диагностирована в соответствии с критериями GINA. Критерии включения в исследование: БА среднетяжелого и тяжелого течения в соответствии с рекомендациями GINA 2011 [4]; возраст от 18 до 70 лет; подписанное и датированное информированное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения: другие заболевания органов дыхания (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония, активный туберкулез, диссеминированные заболевания легких и др.); злокачественные новообразования; беременность и период лактации; тяжелая сердечная недостаточность, соответствующая IV классу по классификации New York Heart Association; тяжелая почечная и печеночная недостаточность; психические заболевания, которые могут ограничивать действительность информированного согласия (на усмотрение исследователя); цереброваскулярные заболевания; БА легкой степени тяжести; прием блокатора кальциевых каналов (верапамила). Необходимо отметить отсутствие стероидорезистентности у обследуемых больных.

Все пациенты в зависимости от степени тяжести заболевания были разделены на 2 группы. В 1 группу были включены 67 (49,26±4,29%) больных БА среднетяжелого течения. Ко 2 группе были отнесены 69 (50,74±4,29%) пациентов с тяжелой астмой (табл.).

Необходимо отметить, что во 2 группе 31 пациент постоянно принимал системные ГКС в дозе 10 [5;15] мг в перерасчете на преднизолон, длительность приема составила по медиане 6 [3;10] лет.

По группам в зависимости от формы БА распределение было следующим: в 1 группе аллергическая астма была отмечена у 44 (65,7±5,8%) больных, неаллергическая – у 23 (34,3±5,8%) пациентов. Во 2 группе у 40 (58±5,9%) пациентов также преобладала аллергическая форма БА, а неаллергическая астма регистрировалась у 29 (42±5,9%) больных. Достоверных различий между исследуемыми группами в зависимости от формы заболевания выявлено не было ($p=0,455$).

Помимо стандартного клинико-функционального обследования проводили забор венозной крови из кубитальной вены локтевого сгиба. Далее выделяли лимфоциты из цельной гепаринизированной периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографин. После этого суспензию лимфоцитов (1 млн клеток в 1 мл) делили на три пробы, каждую из которых инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 минут. Для регистрации спонтанного апоптоза использовалась первая проба (контроль), во второй пробе в качестве индуктора апоптоза применялся дексаметазон (1×10^{-6} М), а в третьей пробе использовалась комбинация дексаметазона (1×10^{-6} М) и блокатора кальциевых каналов верапамила (5×10^{-6} М). Детекция апоптоза проводилась методом TUNEL (*TdT-mediated dUPT nick end*

labeling) согласно протоколу фирмы-производителя набора (Millipore). Подсчитывалось общее количество TUNEL+ клеток с последующим расчетом апоптотического индекса (АИ) на 300 клеток (апоптотический индекс – доля TUNEL+ клеток, выраженная в процен-

тах от общего количества клеток). Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных БА регистрировали дважды в динамике – при обострении заболевания и после его купирования.

Таблица

Общая характеристика больных БА

Показатели		Единицы измерения	1 группа	2 группа	Значимость различий
Возраст (годы)		Me [Q1;Q3]	40 [30;53]	51 [45;55]	p<0,05
Давность заболевания (годы)		Me [Q1;Q3]	3 [1;9]	13 [8;19]	p<0,001
Пол	мужчин	абс / %	19 / 28,4	16 / 23,2	p>0,05
	женщин	абс / %	48 / 71,6	53 / 76,8	p>0,05

Примечание: значимость различий качественных показателей в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия χ^2 . Значимость различий при исследовании количественных показателей оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, достоверность различий между группами при p<0,05.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась при помощи программы SPSS, версия 20.0. Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде абсолютных значений и их процентных долей и стандартных ошибок. В случаях отсутствия нормального распределения переменных, в описательной статистике использовались медиана (Me) и интерквартильный интервал [Q1;Q3]. Проверка нормальности распределения признаков в группах наблюдения проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку статистической значимости различий при исследовании количественных показателей при отсутствии нормального распределения переменных проводили сравнением групп с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Значимость различий качественных показателей в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия Пирсона χ^2 с поправкой на непрерывность. Оценку статистической значимости различий изменения количественных признаков в динамике проводили по непараметрическому критерию Вилкоксона при отсутствии нормального распределения переменных. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования было выявлено, что у больных БА среднетяжелого течения в фазе обострения заболевания АИ в пробе со спонтанным апоптозом составил по медиане 24 [17;30]%. Тогда как в присутствии дексаметазона данный показатель достиг 40 [40;48]%, а в присутствии комбинации дексаметазона и верапамила – 35 [21;42]%. Так, у больных 1 группы регистрировалось статистически значимое увеличение АИ в присутствии дексаметазона (p=0,043) и комбинации дексаметазона и верапамила (p=0,046) в сравнении со спонтанным апоптозом (рис. 1). Увеличение апопто-

тической активности лимфоцитов периферической крови при БА в присутствии индуктора программируемой клеточной гибели объясняется индуцирующим действием ГКС на апоптоз клеток.

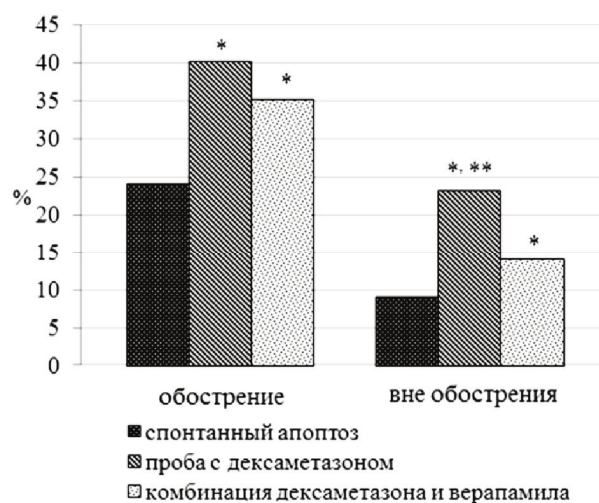


Рис. 1. Апоптотический индекс (в %) у больных БА среднетяжелого течения в динамике заболевания.

Примечание: различия по исследуемым показателям рассчитаны с использованием критерия Манна-Уитни и Вилкоксона.* – достоверность различий между первой пробой и пробами с дексаметазоном и комбинацией дексаметазона и верапамила при p<0,05; ** – достоверность различий между пробой с дексаметазоном при обострении БА и вне его при p<0,05.

После купирования обострения у больных БА среднетяжелого течения уровень АИ в первой пробе составил 9 [3;11]%, а во второй (с дексаметазоном) и третьей (дексаметазон и верапамил) пробах отмечалось достоверное повышение значений анализируемого параметра до 23 [12;39] и 14 [14;17]%, соответственно (p<0,05), что гораздо ниже, чем при обострении заболевания и может свидетельствовать о снижении апоп-

тической активности лимфоцитов периферической крови.

Однако в 1 группе при сравнении АИ между второй и третьей пробами статистически значимых различий выявлено не было как в период обострения БА, так и после его купирования, но отмечалась некоторая тенденция к снижению апоптотической активности в пробе с дексаметазоном и верапамилом.

Известно, что верапамил является эффективным блокатором кальциевых каналов L-типа, влияние которого может играть некоторую роль в реализации дексаметазон-индуцированного апоптоза. Литературные данные свидетельствуют о стимулирующем действии повышенного содержания Ca^{2+} в цитоплазме, которое приводит к реализации митохондриального сигнального пути апоптоза в результате выхода апоптотических белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки [6]. Учитывая участие ионов кальция в процессе программируемой клеточной гибели, возможно предположить воздействие блокаторов кальциевых каналов, приводящее к снижению концентрации внутриклеточного кальция с последующим торможением процесса апоптоза. Хотя вклад последних в реализацию данного механизма достаточно скромный (рис. 1).

В 1 группе при сравнении АИ серии проб в различные фазы заболевания было зарегистрировано статистически значимое снижение дексаметазон-индуцированного апоптоза после купирования обострения ($p=0,040$).

При тяжелой БА в период обострения заболевания АИ в первой пробе составил 15 [5;21]%, во второй – 20 [10;35]%, а в третьей – 24 [8;36]%. Однако достоверных различий в данной серии выявлено не было (рис. 2). Обращает внимание более низкий уровень апоптотической активности во всей серии проб у больных 2 группы в период обострения БА в сравнении с показателями 1 группы. Более того, уровень дексаметазон-индуцированного апоптоза был достоверно меньше ($p=0,028$), чем у больных БА среднетяжелого течения. Это свидетельствует о наличии выраженного персистирующего воспаления в дыхательных путях при тяжелой БА и отчасти является следствием нарушения механизмов регуляции апоптоза, а также снижения ответа на воздействие ГКС.

После купирования обострения АИ в контрольной пробе составил 12 [10;28]%, в пробе с дексаметазоном – 35 [30;42]%, а в пробе с комбинацией дексаметазона и верапамила – 28 [17;37]%. Однако статистически значимых различий в серии проб выявлено не было. Нарушение развития запрограммированной клеточной гибели иммунокомпетентных клеток – одна из причин персистенции воспаления и редукции иммуносупрессивного эффекта ГКС.

Влияние блокатора кальциевых каналов на дексаметазон-индуцированный апоптоз не вызвало существенных изменений в процессе апоптоза лимфоцитов периферической крови при различной степени тяжести БА в периоде обострения заболевания и вне его.

Таким образом, в данной работе показано, что у

больных БА различной степени тяжести процесс модулятор-индуцированного апоптоза имеет некоторые особенности. Повышение апоптотической активности под влиянием дексаметазона отмечается при БА различной степени тяжести. Однако при тяжелом течении заболевания в период обострения ответ значительно снижен. Известно, что персистенция воспаления в воздухоносных путях обеспечивается за счет миграции клеток воспаления в слизистую бронхов и усиления их выживаемости. Таким образом, наличие длительно существующих иммунокомпетентных клеток обусловлено не только их повышенной миграцией в ткани, но и замедлением элиминации клеток вследствие нарушения процессов программируемой клеточной гибели, что четко прослеживается с утяжелением заболевания. Дексаметазон в концентрации 1×10^{-6} М эффективен в качестве индуктора апоптоза лимфоцитов периферической крови больных БА *in vitro*, однако его эффективность заметно снижается в периоде обострения заболевания у больных астмой тяжелого течения.

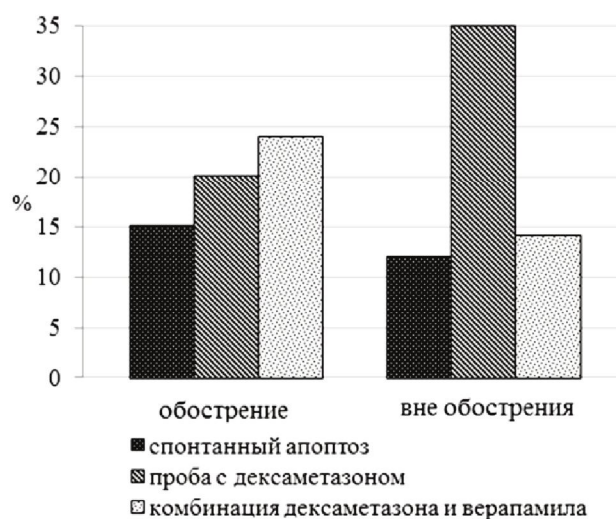


Рис. 2. Апоптотический индекс (в %) у больных тяжелой БА в динамике заболевания.

При анализе влияния верапамила на развитие дексаметазон-индуцированного апоптоза мы установили, что у больных БА в периоде обострения антиапоптотическое действие верапамила, характерное для периода вне обострения заболевания, полностью утрачивается. Подавление механизма поступления кальция в клетки через кальциевые каналы L-типа цитоплазматической мембраны лимфоцитов не оказывает влияния на апоптоз-индуцирующее действие дексаметазона *in vitro*. С учетом того, что L-тип кальциевых каналов плазматической мембраны лимфоцитов экспрессируется преимущественно в Th2-клетках [5], а также доминирующей роли Th2-клеток в продукции цитокинов, актуальных для патогенеза БА, можно предположить, что отсутствие эффекта верапамила как блокатора L-типа кальциевых каналов в отношении дексаметазон-индуцированного апоптоза манифестирует увеличение гиперэкспрессии L-кальциевых каналов в Th2-лимфоцитах при БА, как это ранее было показано в работе [8]. Необходимы дальнейшие исследова-

дования для определения возможного значения этих эффектов в иммунопатогенезе и изменении чувствительности к ГКС у пациентов с БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роль процессов клеточной гибели в развитии воспаления при бронхиальной астме / В.А.Невзорова [и др.] // Тихоокеанский мед. журн. 2006. №2. С.54–58.
2. Скибо Ю.В., Курмаева Н.Ш. Особенности апоптоза лимфоцитов у больных легкой и тяжелой atopической бронхиальной астмой // Практическая медицина. 2012. №61. С.62–68.
3. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. 2011. URL: <http://www.ginasthma.org>
4. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis / C.Giorgi [et al.] // Cell Calcium. 2012. Vol.52, №1. P.36–43.
5. Lymphocyte calcium signaling involves dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels: facts and controversies / B.Gomes [et al.] // Crit. Rev. Immunol. 2004. Vol.24, №6. P.425–447.
6. Jeong S.Y., Seol D.W. The role of mitochondria in apoptosis // BMB Rep. 2008. Vol.41, №1. P.11–22.
7. Effect of verapamil on bronchial goblet cells of asthma: an experimental study on sensitized animals / M.R.Khakzad [et al.] // Pulm. Pharmacol. Ther. 2012. Vol.25, №2. P.163–168.
8. Pelletier L., Guéry J.C. Dihydropyridine receptor blockade in the treatment of asthma // Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov. 2008. Vol.2, №2. P.109–116.
9. Schlossmacher G., Stevens A., White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells // J. Endocrinol. 2011. №1. P.17–25.
10. Apoptosis and airway inflammation in asthma / A.M.Vignola [et al.] // Apoptosis. 2000. Vol.5, №5. P.473–485.
11. New evidence of inflammation in asthma / A.M.Vignola [et al.] // Thorax. 2000. Vol.55, Suppl.2. P.59–60.

REFERENCES

1. Nevzorova V.A., Pazych S.A., Barkhatova D.A., Kudryavtseva V.A. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* 2006; 2:54–58.
2. Skibo Yu.V., Kurmaeva N.Sh. *Prakticheskaya meditsina* 2012; 61:62–68.
3. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. 2011. Available at: <http://www.ginasthma.org>
4. Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J.M., Wieckowski M.R., Pinton P. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell Calcium* 2012; 52(1):36–43.
5. Gomes B., Savignac M., Moreau M., Leclerc C., Lory P., Guéry J.C., Pelletier L. Lymphocyte calcium signaling involves dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels: facts and controversies. *Crit. Rev. Immunol.* 2004; 24(6):425–47.
6. Jeong S.Y., Seol D.W. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 2000; 41(1):11–22.
7. Khakzad M.R., Mirsadraee M., Mohammadpour A., Ghafarzadegan K., Hadi R., Saghari M., Meshkat M. Effect of verapamil on bronchial goblet cells of asthma: an experimental study on sensitized animals. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2012; 25(2):163–168.
8. Pelletier L., Guéry J.C. Dihydropyridine receptor blockade in the treatment of asthma. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2008; 2(2):109–116.
9. Schlossmacher G., Stevens A., White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J. Endocrinol.* 2011; (1):217–225
10. Vignola A.M., Chiappara G., Gagliardo R., Gjomarkaj M., Merendino A., Siena L., Bousquet J., Bon-signore G. Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis* 2000; 5(5):473–485.
11. Vignola A.M., Gagliardo R., Guerrero D., Chiappara G., Chanez P., Bousquet J., Bonsignore G. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax* 2000; 55(Suppl.2):S59–S60.

Поступила 08.05.2013

Контактная информация

Светлана Владимировна Чубарова,
ассистент кафедры внутренних болезней №2,
Красноярский государственный медицинский университет,
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.
E-mail: svetachubarova@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Svetlana V. Chubarova,
MD, Assistant of Department of Internal Medicine №2,
Krasnoyarsk State Medical Academy,
1 Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation.
E-mail: svetachubarova@mail.ru