

# АПОПТОЗ: ХАРАКТЕРИСТИКА, МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

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

*Кафедра патофизиологии (зав. — проф. М.М. Миннибаев) Казанского государственного медицинского университета, Республиканский центр по борьбе со СПИДом (главврач — О.М. Романенко), кафедра аллергологии (зав. — проф. Р.С. Фассахов) Казанской государственной медицинской академии последипломного образования*

Различают две формы гибели клеток — некроз и апоптоз. Некроз представляет собой гибель клеток под воздействием внешних по отношению к клетке агентов повреждающего характера и неадекватных условий внешней среды (изменения рН, механические воздействия, изменение температурного режима, воздействие факторов, повреждающих клеточную мембрану и др.). Некроз проявляется в набухании клетки, сопровождается разрывом мембран вследствие повышения их проницаемости и выходом содержимого клетки в окружающую среду. Гибель клеток в результате некроза наблюдается, в частности, при воспалительных реакциях.

Апоптоз (с греч. “опадание листьев”) представляет собой процесс программированной клеточной гибели (ПКГ), “физиологическая” сущность которой [1] проявляется изменениями как в ядре и цитоплазме клетки, так и в клеточной мембране. В ядре имеют место конденсация хроматина, kariопикноз и последующая его фрагментация. Кроме того, фрагменты ядра, ограниченные мембраной, обнаруживаются за пределами клеток. Иначе их называют апоптотическими тельцами, которые впоследствии подвергаются фагоцитозу. В цитоплазме наблюдаются расширение эндоплазматического ретикулума, конденсация и сморщивание гранул, а также снижение трансмембранного потенциала митохондрий. Изменение в клеточной мембране включает повышение ее проницаемости для небольших молекул (например, пропиона йодида). Морфологически мембрана утрачивает “ворсинчатость” и образует пузырьвидные вздутия. Вследствие реорганизации клеточной мембраны на ее поверхности начинают экспрессироваться некоторые молекулы, не обнаруживаемые в норме (фосфосерин, тромбоспондин и др.).

Одним из признаков, отличающих апоптоз от некроза, является “незаметное” для организма уничтожение клеток, не сопровождающееся повреждением окружающих тканей. Например, по механизму апоптоза элиминируются из организма “стареющие” клетки, ареактивные лимфоциты в процессе их дифференцировки, происходят циклическая регрессия и возрастная инволюция некоторых тканей и органов (в частности, тимуса, половых желез). Таким образом, апоптоз следует рассматривать как необходимое условие существования организма и поддержания его гомеостаза. В наиболее общей форме назначение апоптоза состоит в сохранении постоянства численности клеток, их соотношения и удалении генетически дефектных клеток.

Существует ряд методов, с помощью которых можно исследовать апоптоз, в частности изменения в ядре, цитоплазме клетки, а также в клеточной мембране.

## Методы определения изменений в ядре:

1. Цитофлуориметрия с предварительной обработкой клеток красителем йодистым пропиоидом. Метод основан на выявлении потери клетка-

ми части хроматина при апоптозе. При обработке клеток краситель проникает в апоптотические клетки и взаимодействует с ДНК, что приводит к обнаружению клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК методом проточной цитофлуориметрии [45].

2. Электрофоретическое разделение ДНК. экстрагируемой из клеток, и выявление разрывов ДНК (“феномен лесенки”) [8].

3. Выявление разрывов ДНК методом встраивания в участки разрывов меченых олигонуклеотидов и анализ полученных результатов с помощью цитофлуориметрических и морфологических методов (TUNEL-метод — TdT-mediated dUTR-biotin nick end-labeling) [29].

4. Электронная микроскопия с регистрацией указанных выше морфологических изменений [20].

## Методы определения изменений в цитоплазме:

1. Измерение трансмембранного митохондриального потенциала. При обработке клеток липофильными катионными флуорохромами, тропными к внутренней поверхности митохондриальной мембраны, отмечают снижение трансмембранного потенциала митохондрий. Для этого используют следующие флуорохромы: родамин (Rh123) [16], йодид тетраэтилбензоимидазолкарбоцианина (JC-1) [13], йодид дигексилоксакарбоцианина (DiOC6) [34], хлорометил-X-розамин (CMXRos) [34].

2. Измерение массы митохондрий с помощью флуорохрома NaO (акридного оранжевого) [35].

3. Измерение рН внутри клеток — тенденция к закислению при апоптозе [32].

4. Выявление BcL-2, который содержится, в частности, на наружной митохондриальной мембране, и относится к эндогенным факторам защиты клеток от программированной клеточной гибели [52].

5. Измерение генерируемых клеткой активных форм кислорода [26].

## Об изменениях клеточной мембраны могут свидетельствовать:

1. Обнаружение на поверхности клеток молекул, экспрессирующихся при апоптозе,

по окраске клеток с использованием флуорохрома аннексина V, с помощью которого выявляют молекулы фосфотидилсерина [19, 30];

по окраске клеток с помощью флуорохрома мероцианина (MC540), которая позволяет обнаружить асимметрию липидного слоя клеточной мембраны [50];

по определению на поверхности клеток Fas-рецептора (CD95-антигена), воспринимающего с поверхности клеток сигнал гибели и передающего его внутрь клетки [3, 31]. Наличие этого маркера отражает готовность клетки к апоптозу.

2. Снижение экспрессии ряда антигенов на поверхности клеток (определение антигенов CD4 и CD8 у тимоцитов [15, 57], CD45 у лимфоцитов [9], CD16 (Fc RIII), а также адгезивных молекул у нейтрофилов [17, 18].

3. Изменение проницаемости клеточной мембраны, которые наблюдаются при апоптозе (окрашивание клеток диацетатом флюоресцина и этидиумом бромидом: в первом случае имеет место снижение, во втором — повышение интенсивности окрашивания клеток [49]).

Изменения в клетках при апоптозе приводят также к сдвигу показателей их прямого и бокового рассеивания, оцениваемых методом проточной цитометрии [21].

Морфологические и биохимические изменения при ПКГ происходят одновременно, и их определение позволяет представить последовательность событий, развивающихся в ядре, цитоплазме и клеточной мембране. Получаемые различными авторами данные порой противоречивы и обусловлены, в частности, применением различных методов индукции апоптоза, его оценки, а также использованием различных типов клеток. Так, сравнительный анализ изменений ДНК и плазматической мембраны выявил следующее:

1. Окрашивание клеток МС540 и изменение показателей прямого рассеивания происходят раньше, чем фрагментация ДНК [44]. Эти данные получены на модели индукции апоптоза В-лимфоцитов у мышей.

2. Нарушение структуры липидного слоя клеточной мембраны и конденсация хроматина происходят примерно в одно и то же время [30]. Однако другими авторами показано, что изменения мембраны, оцениваемые с помощью МС540, происходят после конденсации хроматина [11].

Данные, касающиеся взаимосвязи изменений трансмембранного потенциала митохондрий, фрагментации ДНК, изменений проницаемости клеточной мембраны и их очередности также неоднозначны. С одной стороны, показано, что митохондрии остаются интактными в периоде ранней фрагментации ДНК. На ранних этапах не изменяется и проницаемость клеточной мембраны. Функциональные изменения в митохондриях оценивали с помощью флюорохромов Rh123, JC-1 и NAO, а проницаемость мембраны — с помощью йодистого пропидия. Данные о фрагментации ДНК были получены на основании ее электрофореза в агарозном геле, а также по обнаружению гиподиплоидного пика с использованием пропидия йодидом методом проточной цитофлюорометрии [14]. С другой стороны, большая часть данных позволяет предположить, что снижение митохондриального потенциала предшествует фрагментации ДНК [37, 53, 58, 61, 62]. Изменение величины трансмембранного потенциала митохондрий предшествует также и ряду изменений клеточной мембраны (например, экспрессии на наружной поверхности молекул фосфатидилсерина) [62]. Отсюда можно заключить, что снижение трансмембранного потенциала митохондрий является наиболее ранним признаком апоптоза и определяет дальнейшие процессы ПКГ. В частности, показано, что у клеток с меньшим значением митохондриального потенциала фрагментация ДНК происходит быстрее (от 15 минут до нескольких часов) [61].

Тесная корреляция снижения трансмембранного потенциала митохондрий и фрагментации ДНК — основных критериев апоптоза — подтверждается следующими фактами:

а) при дексаметазон-индуцированном апоптозе тимоцитов наблюдаются оба явления, в то же время блокада мРНК и синтеза белка подавляла развитие апоптоза, также затрагивая эти процессы [36];

б) блокада каспазы ICE (см. ниже) предотвращает индуцированное снижение трансмембранного потенциала митохондрий [10];

в) супрессия опухолевого гена p53 предотвращает индуцированное снижение трансмембранного потенциала митохондрий и фрагментацию ДНК [10].

На основании изложенных фактов можно предположить следующую этапность развития процессов апоптоза.

Конденсация хроматина, наблюдаемая при апоптозе, начинается уже примерно через один час после запуска ПКГ. В этот же период происходит падение трансмембранного потенциала митохондрий. Клеточная мембрана изменяется либо в это же время, либо следует за конденсацией хроматина. В целом проницаемость клеточной мембраны повышается через 3—5 часов. Затем ядро фрагментируется ввиду ферментативного расщепления ДНК. На начальных этапах образуются крупные фрагменты, включающие от 700 до 50 тыс. пар оснований. Одновременно продолжают процессы конденсации хроматина и инвагинации ядерной мембраны. На более поздних этапах наблюдается дальнейшая деградации ДНК, сопровождающаяся межнуклеосомальными разрывами. Процесс обычно завершается в течение суток.

Реакции, обуславливающие апоптоз, энергонезависимы, что отличает его от некроза. Некротические реакции энергонезависимы и начинаются с изменений проницаемости клеточной мембраны, проявляются в беспорядочной деградации ДНК, набухании и увеличении размера клеток.

Несмотря на ведущую роль деградации ДНК в развитии апоптоза, он может развиваться и в безъядерных клетках. В этих клетках также могут снижаться трансмембранный потенциал митохондрий, накапливаться токсические кислородные продукты. Это свидетельствует о том, что деградации ДНК не является критерием, определяющим апоптоз клеток, но тем не менее ее можно считать одним из его проявлений. Гибель клеток наступает, вероятно, намного раньше деградации ДНК. Ее причиной может стать, например, дефицит энергии, обеспечивающий репарацию поврежденной ДНК [5].

Известно множество экзогенных и эндогенных факторов, воздействие которых способно индуцировать апоптоз, либо, наоборот, препятствовать данному процессу. Следует отметить, что для различных клеток одни и те же факторы могут проявлять себя как индукторы, так и как ингибиторы апоптоза. В частности, ряд цитокинов, традиционно относимых к факторам, ингибирующим апоптоз у одних типов клеток, могут оказывать противоположное действие на другие типы клеток. Например, ИЛ-10 ингибирует апоптоз у перитонеальных макрофагов [6], но индуцирует апоптоз у Т-лимфоцитов [43] и моноцитов периферической крови [7].  $\gamma$ -ИФН запускает апоптоз у клеток костного мозга, активированных макрофагов, но подавляет его у моноцитов [7]. Более того, в зависимости от функционального состояния одних и тех же клеток эффект цитокинов может быть разнонаправленным: для ранних активированных В-клеток ИЛ-10 является ингибитором апоптоза, а для поздних — его индуктором [27].

Представляется целесообразным систематизировать эти факторы по направленности их действия.

#### **Индукторы апоптоза:**

1. К факторам экзогенного происхождения относят цитокины:  $\beta$ -TGF (трансформирующий фактор роста), TNF (фактор некроза опухоли), ИЛ-1,  $\gamma$ -ИФН, ИЛ-10 (возможен разнонаправленный эффект — см. выше); глюкокортикоиды; ионы  $Ca^{2+}$ ; отсутствие в среде ростковых факторов; потерю контакта клеток с матриксом; ней-

ротрансмиттеры (дофамин, глутамин); термическое воздействие и УФ-излучение; вирусы; бактериальные токсины; химиопрепараты (цисплатин, доксорубин, метотрексат и др.); этанол,  $\beta$ -амилоидный пептид; оксиданты.

2. К факторам эндогенного происхождения относят онкогены *c-myc*, *rel*, *E1A*; опухолевый супрессор *p53*; ген *Nur77*, кодирующий белок стероидного рецептора.

#### Ингибиторы апоптоза:

1. К факторам экзогенного происхождения относят цитокины (ИЛ-2, 3, 4, 5, альфа-интерферон, факторы роста); андрогены и эстрогены; ионы  $Zn^{2+}$ ; нейтральные аминокислоты; гены различных вирусов (*p35* бакуловируса, *LMP1* вируса Эпштейна—Барра,  $\gamma$ -1.34.5 вируса герпеса, *E1B* аденовируса и др.).

2. К факторам эндогенного происхождения принадлежат протоонкоген *Bcl-2*, а также белки этого же семейства *Bcl-x*, *Bfl1*, *Mcl1* и др.

Наиболее известными экзогенными факторами являются цитокины. Их влияние на процессы апоптотической гибели клеток неоднородно. Например, *TNF* индуцирует апоптоз опосредованно через один из двух своих рецепторов *p55* (*TNFR1*), имеющий так называемый “цитоплазматический домен гибели” *TRADD*. Механизм индукции данного типа включает воздействие на указанный выше домен, а затем последовательно на *FADD* (*Fas-associated death domain*) и *RIP* (*Receptor interacting protein*), что приводит к последующей активации каспаз и эндонуклеаз (*DNKазы I и II*), расщепляющих *DNK*. Аналогичный механизм имеет апоптоз клеток, опосредованный через *Fas*-рецептор (*CD95*). Он также включает активацию каспаз и *DNKаз*. Экспрессия *Fas*-рецептора и воздействие на клетку *TNF* тесно взаимосвязаны. Показано, что под влиянием *TNF* “ранние” кроветворные клетки начинают экспрессировать до этого отсутствующий *Fas*-рецептор с одновременным снижением образования внутреннего фактора защиты *Bcl-2* (см. ниже).

К классическим индукторам апоптоза относят также трансформирующий фактор роста, вызывающий апоптоз тучных клеток, гепатоцитов, эпителиальных клеток, фибробластов и других клеток.

В отличие от *TNF* и  $\beta$ -*TGF*, ряд других цитокинов обладает противоположным эффектом. В частности, присутствие в клеточной культуре интерлейкинов 2, 3, 4, 5, 10,  $\gamma$ -интерферона, колониестимулирующих и гемopoэтических факторов препятствует преждевременной гибели клеток *in vitro*.

Антигены и митогены, считающиеся активаторами клеток, при определенных условиях могут индуцировать апоптоз [4, 55]. Было показано, что инкубация лимфоцитов доноров с фитогемагглютинином (ФГА) приводила к образованию части гиподиплоидных клеток, обнаруживаемых после окраски *PI* с помощью проточной цитофлуорометрии [2]. Сигнал к развитию апоптоза может передаваться также через рецепторы, считающиеся традиционно активационными для клеток (например, через рецептор *CD3* у лимфоцитов). Поэтому этот тип апоптоза называют активационным. При этом для запуска апоптоза через активационные рецепторы необходимо выполнение ряда условий: отсутствие в среде интерлейкинов и костимуляций через другие рецепторы (например, *CD28* и *CD40* для *T*- и *B*-лимфоцитов соответственно).

К традиционным экзогенным индукторам относят кортикостероиды. Механизм их действия обусловлен проникновением в клетку и воздей-

ствием на ядерные рецепторы. Однако эта активность реализуется не на всех типах клеток. Наиболее чувствительными являются кортикальные тимоциты и лимфоциты. Эозинофилы также лабильны к действию глюкокортикоидов, и эффект индукции апоптоза продемонстрирован как *in vivo*, так и *in vitro* (см. ниже).

Повышение внутриклеточного содержания  $Ca^{2+}$  создает условия для развития апоптоза [12], и этот процесс можно смоделировать воздействием кальциевых ионофоров на клетку [38]. Механизм этого явления, вероятно, связан с активацией фосфатазы кальциневрина, способствующий образованию факторов транскрипции, регулирующих клеточный цикл. Помимо этого, в присутствии  $Ca^{2+}$  происходит либо непосредственная активация  $Ca^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз, либо их активация через активацию  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз, фосфатаз и фосфолипаз [23, 46, 51], что влечет за собой деградацию *DNK*. Тем не менее активация эндонуклеаз и следующая за ними деградация *DNK* не являются “смертным приговором” для клетки. В пользу этого свидетельствуют факты наличия ПКГ у энуклеированных клеток. Вероятнее всего, клетка погибает при активации репаративных процессов, активизирующихся после начала фрагментации *DNK*. Активация полимеразы и лигазы, “ремонтирующих” поврежденную *DNK*, и последующая реализация ими своих функций сопровождаются резким уменьшением энергозапасов клетки, приводящим в конечном итоге к ее гибели.

*Bcl-2* и ряд других белков (*Bcl-x1*, *Mcl1* и др.) локализованы на наружной поверхности митохондриальной и регулируют заряд их трансмембранного потенциала, снижение величины которого также является одним из проявлений апоптоза клеток. Белок *Bcl-2* также обнаружен на цитозольной стороне эндоплазматической сети. Данный белок входит в состав комплекса ядерной поры, регулируя ионный состав пространства между наружной и внутренней ядерными мембранами, содержащими, как известно, большие запасы  $Ca^{2+}$ . Показано, что *Bcl-2* ингибирует апоптоз клеток, вызванный кальциевыми ионофорами. Противоположный эффект проявляет гомодимер *Bax/Bax*, активирующий сериновые протеазы. Разность соотношения данных белков определяет дальнейший путь жизнедеятельности клетки.

Запуск апоптоза под действием белка *p53* обусловлен способностью, с одной стороны, воспринимать сигнал о наличии нерепарированной *DNK* с последующим подавлением эндогенных факторов защиты (например, *Bcl-2*), а с другой — опосредованно активировать сериновые протеазы (через стимуляцию гомодимера *Bax/Bax*), фрагментирующие *DNK*. Синтез белка *p53* стимулирует облучение, цитостатики и др. Мутации генов, кодирующих синтез белка *p53*, обуславливают длительное выживание клеток и их частое озлокачествление.

Следовательно, процессы клеточного апоптоза могут реализоваться в двух случаях:

1. Под влиянием экзогенных факторов, действующих специфически и через специализированные рецепторы (*Fas*-рецептор), либо неспецифически — через рецепторы, выполняющие другие функции (*FНО*-рецептор, рецепторы для глюкокортикоидов и др.). Кроме того, сигнал к развитию апоптоза может передаваться через рецепторы, считающиеся традиционно активационными для клеток (см. выше). В зависимости от типа клеток и условий, в которых они находятся, один и тот же сигнал таким образом может индуцировать апоптоз и препятствовать его развитию.

2. Отсутствие или недостаточность внутренних факторов, препятствующих развитию апоптоза.

Приступая к обсуждению вопроса о роли апоптоза в патогенезе различных заболеваний, мы должны повторно отметить, что данный процесс является разновидностью клеточной гибели, необходимой для поддержания гомеостаза организма и обуславливающей его нормальную жизнедеятельность.

Повышенная активация ПКГ служит одним из звеньев СПИДа, нейродегенеративных и мисодиспластических заболеваний, ишемических повреждений различных органов. Ингибирование процессов ПКГ наблюдается, например, при опухолевых процессах, аутоиммунных и вирусных заболеваниях. Данное высказывание можно отнести и к заболеваниям, сопровождающимся клеточной инфильтрацией тканей, в частности атопическим.

Главными действующими "лицами" аллергических реакций являются лимфоциты и эозинофилы, обнаруживаемые, в частности, при бронхиальной астме (БА) в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и мокроте в повышенном количестве. Количество этих клеток бывает особенно большим при "отсроченных" аллергических реакциях [42]. Эозинофил является одной из главных клеток-эффекторов, участвующих в патогенезе различных аллергических заболеваний, в том числе БА. Клиническая картина заболевания тесно взаимосвязана с функциональной активностью гранулоцитов данного вида. В частности, в периферической крови больных атопической формой БА и поллинозом количество эозинофилов низкой плотности, представляющих пул активированных клеток, в стадии обострения значительно превышает их количество в периоде ремиссии [22]. Однако гораздо большее значение в патогенезе атопических заболеваний имеет содержание эозинофилов в различных тканях. В процессе миграции эозинофилов в легкие при БА происходит их активация, а хемотактические стимулы (ГМ-КСФ, ИЛ-5, ФАТ и др.) способствуют также и реализации эозинофилами их эффекторных функций в тканях. Наличие в гранулах эозинофилов широкого спектра "агрессивных" ферментов и белков во многом определяет клиническую картину БА, и отнюдь не случайно термин БА отождествляют с термином "хронический эозинофильный десквамирующий бронхит" [54].

Исследование эозинофилов в мокроте больных с обострением БА до и после 2-недельного лечения глюкокортикоидами выявило существенное увеличение числа клеток, претерпевающих апоптоз. Данное изменение сопровождалось улучшением функций внешнего дыхания, последующим уменьшением тканевой эозинофилии и появлением составных компонентов эозинофилов внутри макрофагов [60].

В опытах *in vitro* убедительно доказана роль глюкокортикоидов как индукторов апоптоза эозинофилов. Эффект был специфичным, так как блокировался антагонистом глюкокортикоидных рецепторов RU38486 [47]. В аналогичных условиях дексаметазон блокировал апоптоз нейтрофилов [39]. Следовательно, эозинофил является одной из клеток, определяющей течение БА, а апоптоз эозинофилов представляет собой процесс очищения легких от клеток, вызывающих их повреждение. С учетом важной роли аллергического воспаления легких преимущественно эозинофильного характера внимание исследователей было обращено в основном к двум типам клеток: лимфоцитам как к клеткам регуляторного звена и эозинофилам как к клеткам-эффекторам. Апоптоз при атопических заболеваниях, в частности

атопической бронхиальной астме (АБА), изучали в нескольких направлениях.

**1. Экспрессия CD95 и Fas-лиганда.** Показано, что лимфоциты периферической крови, меченные по CD3, у больных АБА несут на своей поверхности только Fas-рецептор (CD95) и не имеют Fas-лиганда. При исследовании аналогичных клеток, полученных из БАЛ, установлено значительное повышение числа CD95+лимфоцитов ( $95,3 \pm 6,1\%$ ), а количество клеток, несущих FasL, было ничтожно мало ( $1,0 \pm 0,7\%$ ). Ингаляция специфического аллергена приводила к незначительному увеличению количества лимфоцитов ( $4,1 \pm 2,8\%$ ), несущих на своей поверхности Fas-лиганда, в то время как количество CD95+ клеток оставалось без изменений [31]. Поэтому нет оснований утверждать зависимость процессов апоптоза лимфоцитов от непосредственного соотношения и взаимодействия Fas-рецептора и Fas-лиганда у больных АБА, выявляемую указанным выше методом.

Участие Fas-рецептора в индукции апоптоза изучено на эозинофилах периферической крови и тканей. Полученные данные неоднозначны. С одной стороны, показано, что инкубация эозинофилов с моноклональными антителами к Fas-рецептору приводит к их апоптотической гибели *in vitro*. Применение данных антител у лиц с поллипами носа существенно снижало тканевую эозинофилию [56]. С другой стороны, у лиц с эозинофилией количество клеток, несущих Fas-рецептор, существенно снижается [24]. Также выявлено, что у больных атопическим дерматитом [59] и у доноров [33] внесение цитокинов (ИЛ-3, ИЛ-5, ГМ-КСФ), продлевающих выживаемость клеток *in vitro*, в культуру эозинофилов не приводит к изменению количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD95. Аналогичные данные, касающиеся указанных выше цитокинов, продлевающих жизнь эозинофилов *in vitro*, были получены и другими исследователями [28, 48].

В то же время инкубация эозинофилов с  $\gamma$ -ИФН и ФНО, приводящая к апоптозу клеток, повышала экспрессию CD95. Наблюдался синергизм этих факторов, а добавление в культуру ИЛ-3, ИЛ-5 и ГМ-КСФ существенно снижало экспрессию CD95 на эозинофилах, предварительно активированных  $\gamma$ -ИФН и ФНО. Было также продемонстрировано, что повышение экспрессии CD95 на поверхности эозинофилов приводило к апоптозу, индуцированному FasL [33].

Помимо  $\gamma$ -ИФН и ФНО способностью индуцировать апоптоз эозинофилов периферической крови обладает ИЛ-4 [59]. Эффект был дозо- и времязависимым и блокировался моноклональными антителами к ИЛ-4. Однако в отличие от  $\gamma$ -ИФН и ФНО индукция апоптоза под влиянием ИЛ-4 не была обусловлена повышением экспрессии CD95. Приведенные факты тем не менее не противоречат друг другу, а лишь отвергают приоритетную роль Fas-рецептора в индукции апоптоза.

**2. Экспрессия Bcl-2.** Анализ клеток мокроты у лиц БА с помощью моноклональных антител к Bcl-2 выявил следующее: у лиц с БА легкой степени, а также у доноров экспрессия данного белка была незначительной, в то время как у лиц БА средней и тяжелой степени экспрессия данного protoонкогена существенно увеличивалась. Около 90% клеток БАЛ экспрессируют данный белок у лиц с тяжелой формой БА и около 50% Bcl-2-положительных клеток обнаруживали у лиц с БА средней тяжести. Экспрессия Bcl-2 коррелировала с уровнем эозинофильного катионного белка, являющегося общепризнанным маркером тяжести заболевания [52].

**3. Электронная микроскопия и выявление морфологических признаков апоптоза.** На основании морфологических признаков обнаружены характерные для апоптоза изменения в эозинофилах у больных аллергическим ринитом и atopической бронхиальной астмой, наблюдаемые в процессе их лечения [20].

**4. Выявление изменений ДНК.** При исследовании апоптоза при БА с помощью йодистого пропидия было установлено следующее.

Лимфоциты периферической крови больных БА показали большую выживаемость в течение 72 и 144 часов при инкубации в среде RPMI, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки, по сравнению с лимфоцитами доноров. Эти данные свидетельствуют о замедлении процессов "самоуничтожения" клеток при БА. Тем не менее лимфоциты у больных БА оказались более восприимчивыми к индуцированию апоптоза с помощью стероидного препарата флутиказона пропионата по сравнению с лимфоцитами здоровых лиц [41]. Аналогичный эффект наблюдался в экспериментах с использованием зафирлукаста (антагонист лейкотриеновых рецепторов). Препарат не оказывал влияния на процесс апоптоза у здоровых лиц, в то время как при инкубации лимфоцитов больных БА с указанным выше препаратом наблюдалось значительное увеличение числа Т-клеток, подвергшихся апоптозу [40].

**5. Исследование роли цитокинов в индукции и предотвращении апоптоза эозинофилов.** Показано, что инкубация эозинофилов с ГМ-КСФ предотвращала апоптотическую гибель эозинофилов у здоровых лиц и больных БА *in vitro*. Специфичность этого влияния подтверждалась применением E2IR — синтетического аналога ГМ-КСФ, являющегося рецепторным антагонистом, блокирующим эффект указанного выше цитокина [28].

В других исследованиях продемонстрирован предотвращающий эффект ИЛ-5 на апоптоз эозинофилов [48]. Инкубация эозинофилов с цитокином существенно повышала их выживаемость *in vitro*. Исследуя возможные механизмы данного явления, авторы выявили влияние ИЛ-5 на экспрессию Vcl-2, которая под влиянием этого цитокина повышалась. Исследование рекомбинантного  $\gamma$ -ИФН на выживаемость эозинофилов в культуре дало противоположный эффект. Данный цитокин усиливал апоптотическую гибель клеток. Однако этот эффект не был обусловлен влиянием на экспрессию Vcl-2, что лишний раз подтверждает отсутствие единого механизма индукции апоптоза и единых факторов защиты клеток от ПКГ.

Представляется интересным тот факт, что если для  $\gamma$ -ИФН характерно однонаправленное действие на эозинофилы и лимфоциты (для этих клеток  $\gamma$ -ИФН служит физиологическим активатором апоптоза), то ИЛ-4, являясь индуктором апоптоза эозинофилов, считается в то же время традиционным физиологическим ингибитором апоптоза CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Аналогичным эффектом по отношению к лимфоцитам обладает ИЛ-2.

Факты индукции и супрессии апоптоза клеток, играющих немаловажную роль в патогенезе atopических заболеваний, весьма многочисленны и порой противоречивы. Тем не менее анализ изложенных выше фактов позволяет нам предложить одну из гипотез патогенеза atopических заболеваний (например, АБА и поллиноза) с позиции ПКГ.

Активация под влиянием комплекса АГ-АТ тканевых базофилов приводит к развитию первичной аллергической реакции, но в то же время способствует миграции в ткани клеток-эффекто-

ров периферической крови. Хемотаксис данных клеток в ткани (слизистая носа, легкие) вызывает активацию клеток и выброс БАВ, обуславливая во многом клиническую картину указанных выше заболеваний, протекающих по типу аллергических реакций "отсроченного типа". Клетки, мигрировавшие в ткани, проявляют удивительную живучесть и устойчивость к различного рода воздействиям, обусловленную рядом обстоятельств, которые делают их наименее уязвимыми к апоптотической гибели:

1. Миграция эозинофилов из периферической крови в ткани осуществляется под действием хемотаксических факторов: ФАТ, лейкотриенов С4 и В4. К этой группе следует отнести также и шитокины (в первую очередь ГМ-КСФ, ИЛ-5). Выброс большого количества цитокинов, факторов роста из места первичной аллергической реакции увеличивает выживаемость мигрировавших клеток и препятствует тем самым их апоптотической гибели.

2. В процессе миграции данные клетки активируются и на их поверхности появляются молекулы поздней активации (VLA-4), относящиеся к семейству интегринов и способствующих адгезии клеток. Адгезия эозинофилов к фибронектину через  $\beta$ -1-интегрин приводит к увеличению продолжительности их выживаемости *in vitro* и к снижению уровня экспрессии Fas-антигена [25].

3. Заслуживает несомненного внимания факт активации внутренней программы защиты клеток, выражающийся в повышении содержания белка Bcl-2.

Перечисленное представляет собой далеко не полный перечень приобретения устойчивости эозинофилов к ПКГ. Однако их оказывается достаточно, чтобы замкнуть "порочный круг" в патогенезе данных заболеваний и привести к хронизации процесса. Длительно живущая в тканях клетка постоянно подвергается воздействию факторов микроокружения (медиаторов аллергии и цитокинов, в частности). Воздействие медиаторов, в том числе собственных, запускает каскад реакций, вызывающих выброс новой порции БАВ, усиливающих повреждение, и, что немаловажно, способствует привлечению в ткани новых клеток эффекторного звена, а именно эозинофилов. Повышенный цитокиновый фон, наблюдаемый в тканях, способствует приобретению эозинофилами устойчивости к апоптозу, что является причиной накопления данного типа клеток в тканях. Данные о наличии в тканях цитокинов, обладающих способностью запускать процессы ПКГ, немногочисленны. Однако есть факты, свидетельствующие о том, что при atopических заболеваниях наблюдается цитокиновый дисбаланс. У больных с atopическими заболеваниями (например, при atopическом дерматите) наблюдается снижение уровня  $\gamma$ -ИФН в периферической крови, коррелирующее с тяжестью заболеваний и имеющее неблагоприятное прогностическое значение. Приведенные нами данные об индукции *in vitro* апоптоза эозинофилов с помощью ИЛ-4, на наш взгляд, не являются фактом, опровергающим нашу гипотезу о цитокиновой роли в защите эозинофилов от ПКГ. Индукция апоптоза эозинофилов под влиянием ИЛ-4, вероятно, нивелируется значительным количеством факторов, активирующих клетки и привлекающих их в ткани. Данные факторы (в том числе цитокины) обладают противоположным по сравнению с ИЛ-4 эффектом в отношении индукции процессов ПКГ у эозинофилов. Исследований с преинкубацией эозинофилов с ИЛ-5 и ГМ-КСФ и последующим внесением в культуру клеток ИЛ-4 на момент написания данного

обзора мы не обнаружили. Возможно, что активированная клетка может терять восприимчивость к запуску процесса ПКГ под действием определенных факторов. В пользу выдвинутой нами гипотезы свидетельствует также сниженная экспрессия CD95 на эозинофилах, инкубированных с классическими индукторами апоптоза — ФНО и  $\gamma$ -ИФН в последующем добавлении ИЛ-3, ИЛ-5 и GM-KCF.

Таким образом, при atopических заболеваниях имеет место нарушение элиминации клеток (в частности эозинофилов) из очага хронического воспаления, способствующего накоплению этих клеток в органах-мишенях и обуславливающих во многом клиническую картину заболеваний. Для коррекции хронического воспаления тканей при atopических заболеваниях необходимо воздействие на несколько звеньев их патогенеза. В частности, на наш взгляд, представляется перспективными блокада процессов хемотаксиса эозинофилов в ткани, препятствие их адгезии (например, к стенке эндотелия сосудов), воздействие на эозинофилопоэз. Однако эти методы недостаточно эффективны в том случае, если эозинофилы уже мигрировали в ткани. Эозинофил, находящийся в активированном состоянии, может постоянно генерировать факторы, препятствующие его элиминации из тканей посредством ПКГ, а также способствовать привлечению новых клеток-эффекторов. Соответственно одной из задач является нейтрализация источника посредством запуска процессов ПКГ тканевых эозинофилов. Поэтому исследования, посвященные изучению апоптоза эозинофилов при atopических заболеваниях, представляются весьма актуальными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. — СПб, 1996.
2. Никонова М.Ф., Литвина М.М. и др. // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 20—23.
3. Полоухина Е.Р., Заботина Т.Н. и др. // Бюлл. экспер. биол. — 1998. — Т. 125. — С. 670.
4. Ярилин А.А. // Иммунология. — 1996. — № 6. — С. 9—12.
5. Ярилин А.А. // Пат. физиол. — 1998. — № 2. — С. 38—48.
6. Arai T., Hiromatsu M. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1995. — Vol. 213. — P. 600—607.
7. Bach M.K., Brashler J.R. // Int. Arch. Allergy Immunol. — 1995. — Vol. 231. — P. 147—151.
8. Bettuzzi S., Troiano L. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1991. — Vol. 175. — P. 810—815.
9. Carbonari M., Cibati M. et al. // Blood. — 1994. — Vol. 83. — P. 1268—1277.
10. Castedo M., Hirsch T. et al. // J. Immunol. — 1996. — Vol. 157. — P. 512—521.
11. Chiu L., Cherwinski H. et al. // J. Immunol. Methods. — 1996. — Vol. 189. — P. 157—171.
12. Clapham D.E. // Cell. — 1995. — Vol. 80. — P. 259—268.
13. Cossarizza A., Baccarani C. et al. // Biochim. Biophys. Res. Commun. — 1993. — Vol. 197. — P. 40—45.
14. Cossarizza A., Kalashnikova G. et al. // Exp. Cell Research. — 1994. — Vol. 214. — P. 323—330.
15. Currow S.J., Barad M. et al. // Cytometry. — 1994. — Vol. 16. — P. 41—48.
16. Darzynkiewicz Z., Staiano-Coco L. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 76. — P. 2383—2387.
17. Dransfield I., Buckle A-M. et al. // J. Immunol. — 1994. — Vol. 153. — P. 1254—1263.
18. Dransfield I., Stocks S.C. et al. // Blood. — 1995. — Vol. 85. — P. 3264—3273.
19. Fadok V.A., Voelker D.R. et al. // J. Immunol. — 1992. — Vol. 148. — P. 2207—2216.
20. Foresi A., Teodoro C. et al. // Abstr. of Europ. Respir. Society. — Berlin, 1997.
21. Frey T. // Cytometry. — 1997. — Vol. 28. — P. 208—213.
22. Frick W.E., Sedjwick J.B. et al. // J. Allergy Clin Immunol. — 1988. — P. 208—213.
23. Furuya Y., Lundmo R. et al. // Cancer Res. — 1994. — Vol. 54. — P. 6167—6175.
24. Heberstreit H., Yousefi S. et al. // J. Immunol. — 1996. — Vol. 26. — P. 1775—1780.
25. Higashimoto I., Chihara J. et al. // Ant. Arch. Allergy Immunol. — 1996. — Vol. 111. — P. 66—69.
26. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N. et al. // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 241—251.
27. Itoh K., Hirohata S. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 154. — P. 4341—4350.
28. Iversen P.O., Robinson D. et al. // J. Immunol. — 1997. — Vol. 156. — P. 1628—1632.
29. Kodama T., Matsuyama T. et al. // Clin. Exp. Allergy. — 1998. — Vol. 28. — P. 1435—1443.
30. Koopman G., Reutelingsperger C.P.M. et al. // Blood. — 1994. — Vol. 84. — P. 1415—1420.
31. Krug N., Wulf K. et al. // Abstr. of Europ. Respir. Society. — Berlin, 1997.
32. Li J., Eastman A. // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 3203—3211.
33. Luttmann W., Opfer A. et al. // Eur. J. Immunol. — 1998. — Vol. 28. — P. 2057—2065.
34. Macho A., Decaudin D. et al. // Cytometry. — 1996. — Vol. 25. — P. 333—340.
35. Maftah A., Peti J.M. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 164. — P. 185—190.
36. Marchetti P., Castedo M. et al. // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 184. — P. 1155—1160.
37. Marchetti P., Susin S.A. et al. // Cancer Res. — 1996. — Vol. 56. — P. 2033—2038.
38. McConkey D.J., Nicoretta P. et al. // Arch. Biochem. Biophys. — 1989. — Vol. 269. — P. 365—370.
39. Meagher L.C., Cousin J.M. et al. // J. Immunol. — 1996. — Vol. 156. — P. 4422—4428.
40. Melis M., Siena A. et al. // Abstr. of Europ. Respir. Society. — Berlin, 1997.
41. Melis M., Siena A. et al. // Abstr. of Europ. Respir. Society. — Berlin, 1997.
42. Metzger W.J., Zavala D. et al. // J. Allergy Clin Immunol. — 1987. — Vol. 135. — P. 433.
43. Mignon-Godefroy K., Rott O. et al. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 154. — P. 6634—6643.
44. Mover D.A., Peckham D.W. et al. // J. Immunol. — 1994. — Vol. 152. — P. 4832—4842.
45. Nicoletti I., Migliorati G. et al. // J. Immunol. Methods. — 1991. — Vol. 139. — P. 271—279.
46. Nicotera P., Zhivotovskiy B. et al. // Cell. Calcium. — 1994. — Vol. 16. — P. 279—288.
47. Nitto T., Eujimori H. et al. // Eur. L. Pharmacol. — 1998. — Vol. 354. — P. 73—81.
48. Ochiai K., Kagami M. et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1997. — Vol. 107. — P. 198—204.
49. Ormerod M.G. // CMB. — 1994. — Vol. 1. — P. 35—43.
50. Ormerod M.G., Sun X.M. et al. // Cytometry. — 1993. — Vol. 14. — P. 595—602.
51. Orrenius S., Nicotera P. // J. Neural. Transm. Suppl. — 1994. — Vol. 43. — P. 1—11.
52. Panagou P., Karameris A. et al. // J. Cell Biol. — 1995. — Vol. 130. — P. 157—167.
53. Petit P.X., LeCocuer H. et al. // J. Cell Biol. — 1995. — Vol. 130. — P. 157—167.
54. Reed C.E. // J. Allergy. — 1986. — Vol. 77. — P. 538.
55. Russel J.H., White C.L. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88. — P. 2151—2155.
56. Simon H.U., Youself S. et al. // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158. — P. 3902—3908.
57. Swat W., Ignatowicz K. et al. // J. Immunol. Methods. — 1991. — Vol. 137. — P. 79—87.
58. Vayssiere J.-L., Petite P.X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 11752—11756.
59. Wedi B., Raap U. et al. // J. Allergy Clin Immunol. — 1998. — Vol. 102 (6 Pt 1). — P. 1013—1020.
60. Woolley K/L., Gibson P.G. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1996. — Vol. 154. — P. 237—243.
61. Zamzani N., Marchetti P. et al. // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 181. — P. 1661—1672.
62. Zamzani N., Marchetti P. et al. // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 182. — P. 367—377.