

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.248-085.357.45-07:616.155.32-092.18

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

МЕХАНИЗМЫ ДЕКСАМЕТАЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Кафедра патофизиологии Казанского государственного медицинского университета;
Республиканский Центр по борьбе со СПИДом Минздрава РТ;
Кафедра аллергологии Казанской государственной медицинской академии

MECHANISMS OF DEXAMETAZONE-INDUCED APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES IN ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

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

Summary

Study results of spontaneous and dexamethazone (DEX)-induced or Ca^{2+} ionophor-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes (PBL) in healthy donors and atopic asthma (BA) patients are shown at the present work. The apoptosis was evaluated by several parameters: change in mitochondrial potential (MP), a level of phosphatidylserine (PS) expression on the outer leaflet of the cell membrane, forward (FSC) and side scatter (SSC) parameters and DNA fragmentation using flow cytometry. PBL of BA patients incubated in a culture showed later and less intensive DNA fragmentation in comparison with the controls. There were no differences between spontaneous MP and PS dynamics between the study groups. The DEX induced DNA fragmentation significantly earlier and greater after 72, 96 and 120 hrs of the incubation in the BA patients than in the controls. PBL incubation with DEX in the BA patients showed a significant decrease in the MP after 48 hrs of the incubation and later compared with the donors. The DEX-induced MP reduction correlated with the increase in the PS expression level. The analogous results were obtained for the Ca^{2+} ionophor-induced apoptosis. They demonstrated the resistance of PBL to spontaneous apoptosis in BA patients. The DEX-induced apoptosis of PBL was mitochondria-dependent. The PBL sensitivity to the DEX-induced apoptosis in the BA patients may be provided by their MP significant shifts compared with the controls.

Резюме

Изучали механизмы спонтанного апоптоза лимфоцитов (Лф) периферической крови доноров и больных атопической бронхиальной астмой (АБА), а также апоптоза, индуцированного дексаметазоном (Дн) и ионофором Ca^{2+} . В качестве маркеров апоптоза Лф использовали динамику изменения величины митохондриального потенциала (МП), уровня экспрессии фосфатидилсерина (ФС), параметров прямого и бокового светорассеивания, а также фрагментации ДНК. Изучаемые параметры апоптоза оценивали методом проточной цитофлуорометрии. У Лф больных АБА при инкубации в среде фрагментации ДНК наблюдается в меньшей степени и на более поздних сроках по сравнению с контролем. Различий в остальных изучаемых показателях апоптоза Лф между исследуемыми группами не выявлено. Дн индуцирует фрагментацию ДНК у Лф больных АБА на более ранних сроках и в большей степени при 72, 96 и 120 ч инкубации по сравнению с контролем. Инкубация Лф больных АБА с Дн приводила к значительному снижению их МП по сравнению с контролем, начиная с 48 ч инкубации. Дн-индуцированное снижение МП коррелирует с повышением уровня экспрессии ФС. Аналогичные результаты получены при апоптозе Лф, индуцированном ионофором Ca^{2+} . Результаты свидетельствуют об устойчивости Лф больных АБА к спонтанному апоптозу. Дн-индуцированный апоптоз Лф является митохондриально-опосредованным, а чувствительность Лф больных АБА к Дн-индуцированному апоптозу может быть обусловлена значительными (по сравнению с контролем) изменениями величины их МП.

Известно, что atopические заболевания и, в частности, atopическая бронхиальная астма (АБА) сопровождаются инфильтрацией бронхиального дерева клетками, мигрировавшими из кровяного русла. К ним относятся в первую очередь лимфоциты (Лф) и эозинофилы (Эф). Этот факт подтвержден многочисленными исследователями [7,13]. Также известно, что клеткам, мигрировавшим в ткани, отведен строго определенный срок жизни, по истечении которого они подвергаются элиминации посредством запуска процесса их программированной клеточной гибели (ПКГ), или апоптоз. Длительный характер течения atopических заболеваний, в том числе АБА, позволяет предположить, что одной из причин хронизации процесса является нарушение элиминации клеток из легких вследствие нарушений запуска и регулирования (как внеклеточного, так и внутриклеточного) процессов апоптоза.

Факторы, участвующие в регуляции процессов ПКГ, многочисленны и разнообразны и их перечисление не входит в нашу задачу. Следует отметить лишь то, что в последнее время при изучении механизмов апоптоза большое внимание уделяется митохондриям. Этот факт не случаен, так как в процессе ПКГ из них выделяется большое количество биологически активных веществ (БАВ), крайне необходимых для перехода апоптоза в конечную и необратимую стадию, сопровождающуюся упорядоченной деградацией ДНК [9]. К ним относятся апоптозиндуцирующий фактор, цитохром *c*, каспазы 2 и 9 и др. Считается, что высвобождение данных факторов из митохондрий тесно связано с величиной МП. Следовательно, изменение (снижение) величины МП позволяет говорить о высвобождении их из митохондрий в цитозоль и вовлечении митохондрий в процесс ПКГ. Участие данных органелл в процессах ПКГ обусловлено также присутствием в них разнообразных белков (*bcl-x*, *bcl-2* и др.), являющихся внутриклеточными регуляторами апоптоза. Тем не менее, несмотря на большое количество исследований, посвященных участию митохондрий в апоптозе, до настоящего времени не существует однозначного мнения, касающегося их обязательного участия в ПКГ [2,4-6,10,18,22].

Нарушение элиминации клеток из органов-мишеней может быть обусловлено также ослаблением экспрессии на их клеточной поверхности молекул (фосфатидилсерин, тромбосподин и др.), сигнализирующих об апоптозе и обеспечивающих их распознавание и последующее переваривание макрофагами. В частности, небезосновательным представляется существующее мнение о том, что причиной длительного воспаления в легких при АБА является не нарушение процессов регуляции апоптоза вышеуказанных клеток, а нарушение их распознавания. В результате этого "апоптотирующие" Эф не фагоцитируются макрофагами, а агрессивные БАВ (в частности, основной щелочной белок и др.) высвобождаются во внеклеточное пространство и существенно усиливают повреждение бронхиального дерева [19,25].

В последнее время в терапии АБА широкое распространение получило применение ингаляционных глюкокортикоидов (ГК). Долгое время считали, что традиционной мишенью ГК как индукторов апоптоза являются незрелые Лф. Однако недавно было показано, что определенные субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов (НК-клетки, цитотоксические Лф, Т-хелперы) подвергаются апоптозу под влиянием ГК. В противоположность этому считается, что В-лимфоциты резистентны к действию ГК. Также убедительно доказана способность ГК индуцировать апоптоз Эф [13]. Следовательно, способность ГК индуцировать апоптоз клеток, инфильтрирующих бронхиальное дерево при АБА, может являться одним из факторов, обуславливающих их клиническую эффективность. Проведенные исследования показали, что применение ГК приводило к уменьшению количества клеток, мигрировавших в легкие после ингаляции специфического аллергена [14,20].

Несмотря на эти относительно давно известные факты, механизмы запуска процессов ПКГ под влиянием ГК остаются малоизученными. Показано, что их способность вызывать апоптоз может быть обусловлена, в частности, активацией Ca^{2+} -зависимых эндонуклеаз. Ca^{2+} -опосредованный механизм индукции апоптоза под влиянием ГК подтверждается тем, что в ядрах тимоцитов, обработанных ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , наблюдается такая же картина фрагментации ДНК, как и в тимocyтах, обработанных дексаметазоном (Дн). Показано, что похожая конденсация хроматина и деградация ДНК, полученная при Дн-индуцированном апоптозе, может быть достигнута обработкой клеток веществами, повышающими уровень внутриклеточного Ca^{2+} [3]. Таким образом, изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} считается одним из факторов, необходимых для реализации программы запуска апоптоза, в том числе ГК-индуцированного.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение некоторых механизмов спонтанного и Дн-индуцированного апоптоза Лф доноров и больных АБА.

Материалы и методы

Объектом исследований явились Лф периферической крови 26 больных АБА и 24 здоровых доноров. Группу больных АБА составляли лица с легкой и средней степенью заболевания, на момент забора крови не получавшие ГК. Лф выделяли из периферической крови (20 мл) путем центрифугирования на градиенте плотности перколлы ("Pharmacia"), предварительно осадив эритроциты 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-глутамина ("Flow"), гентамицина (100 мкг/мл). Клетки инкубировали с Дн ("Sigma") (10^{-4} – 10^{-6} М), ионо-

фором Ca^{2+} A23187 ("Sigma") (1–5 мкМ), m-CLCCP ("Sigma") (50–150 мкМ). Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 1–6 сут.

Оценка апоптоза Лф осуществлялась методом проточной цитофлуориметрии на приборе *Facscan* ("Becton Dickinson") по следующим параметрам.

1. При окрашивании ДНК Лф с помощью гипотонического раствора пропидия йодида (PI) ("Sigma"), содержащего 0,1% тритона X-100 и 0,1% цитрата натрия, клетки предварительно фиксировали 70° этанолом. Подсчитывали процент клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне гистограммы (M2), располагающейся левее основного пика (M3), соответствующего диплоидным клеткам. Известно, что именно в гиподиплоидной зоне локализуются клетки, подвергшиеся апоптозу. Некротические клетки располагались в зоне M1 и отсекались из анализа курсором. Клетки, располагающиеся в зоне M4, отражали процесс пролиферации Лф. Регистрацию результатов проводили на втором детекторе (FI2) флюоресценции [16].

2. Изменение величины митохондриального потенциала (МП) измеряли с помощью флюорохромов CMX-ROS ("Molecular Probes") [11] и DiOC₆

("Sigma") [4]. Оценку величины МП по флюоресценции CMX-ROS и DiOC₆ проводили соответственно на втором (FL2) и первом (FL1) детекторах флюоресценции. В качестве контроля уровня флюоресценции флюорохромов, используемых для оценки величины МП, в отдельных экспериментах клетки инкубировали 15 мин с m-CLCCP ("Sigma") (150 мкМ). Данное вещество является специфическим индуктором, снижающим величину МП.

3. Экспрессию фосфатидилсерина (ФС) определяли с помощью флюорохрома MC540 ("Sigma"). Регистрацию результатов проводили на втором детекторе (FI2) флюоресценции [15].

4. Оценка показателей прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания. Об изменении данных показателей судили по смещению основного "гейта" свежевыделенных Лф периферической крови.

Результаты исследований

Культивирование в среде RPMI Лф доноров и больных АБА индуцировало с течением времени их гибель. Часть клеток погибала по типу некроза, часть — посредством апоптоза. Показано, что сни-

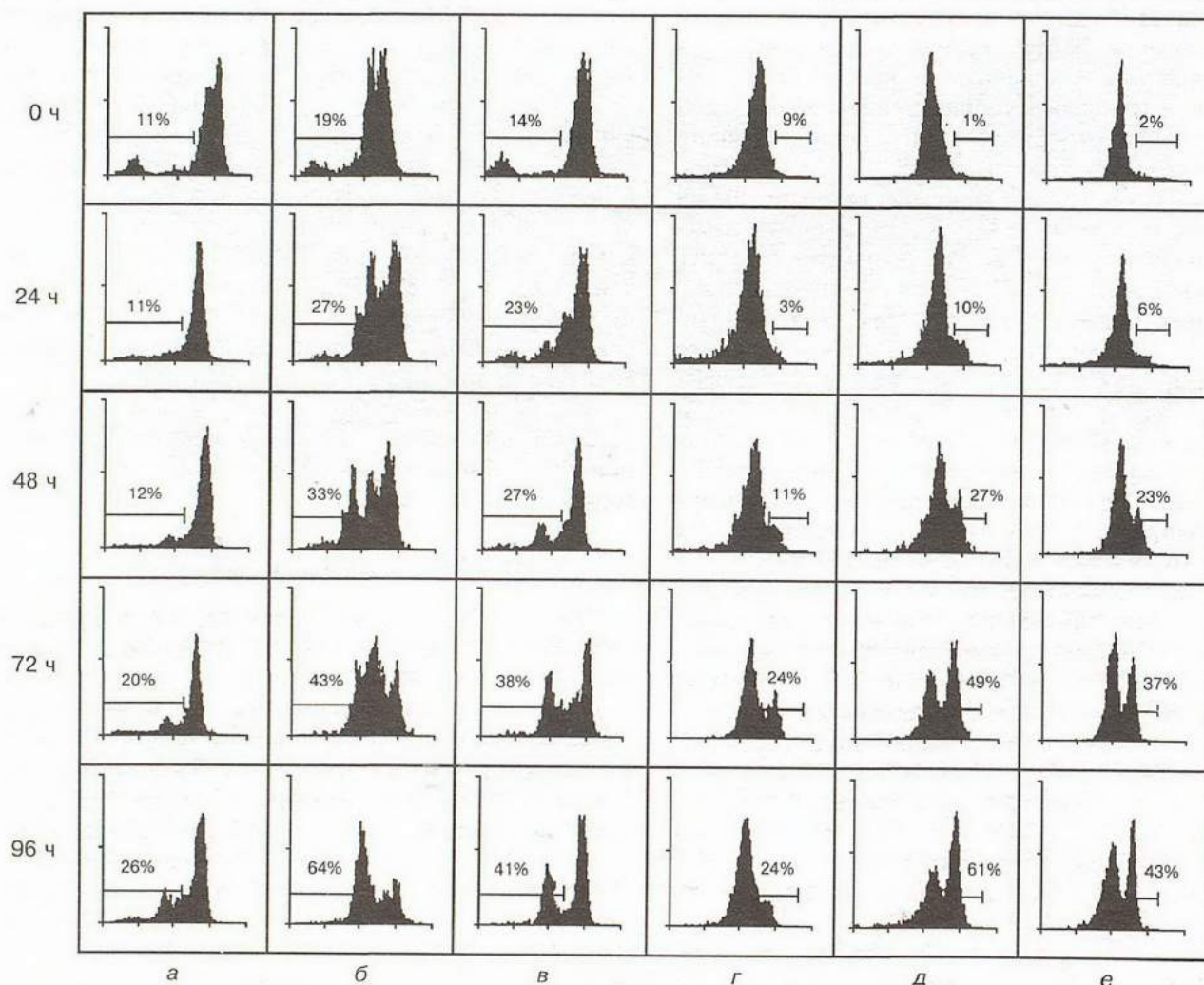


Рис. 1. Цитофлуорограмма величины митохондриального потенциала и экспрессии фосфатидилсерина на лимфоцитах доноров. Здесь и на рис. 2: а, б, в — CMX-Ros, г, д, е — MC540; а, г — контроль, б, д — инкубация с A23187 (2 мкМ), в, е — инкубация с Дн (10^{-4} М).

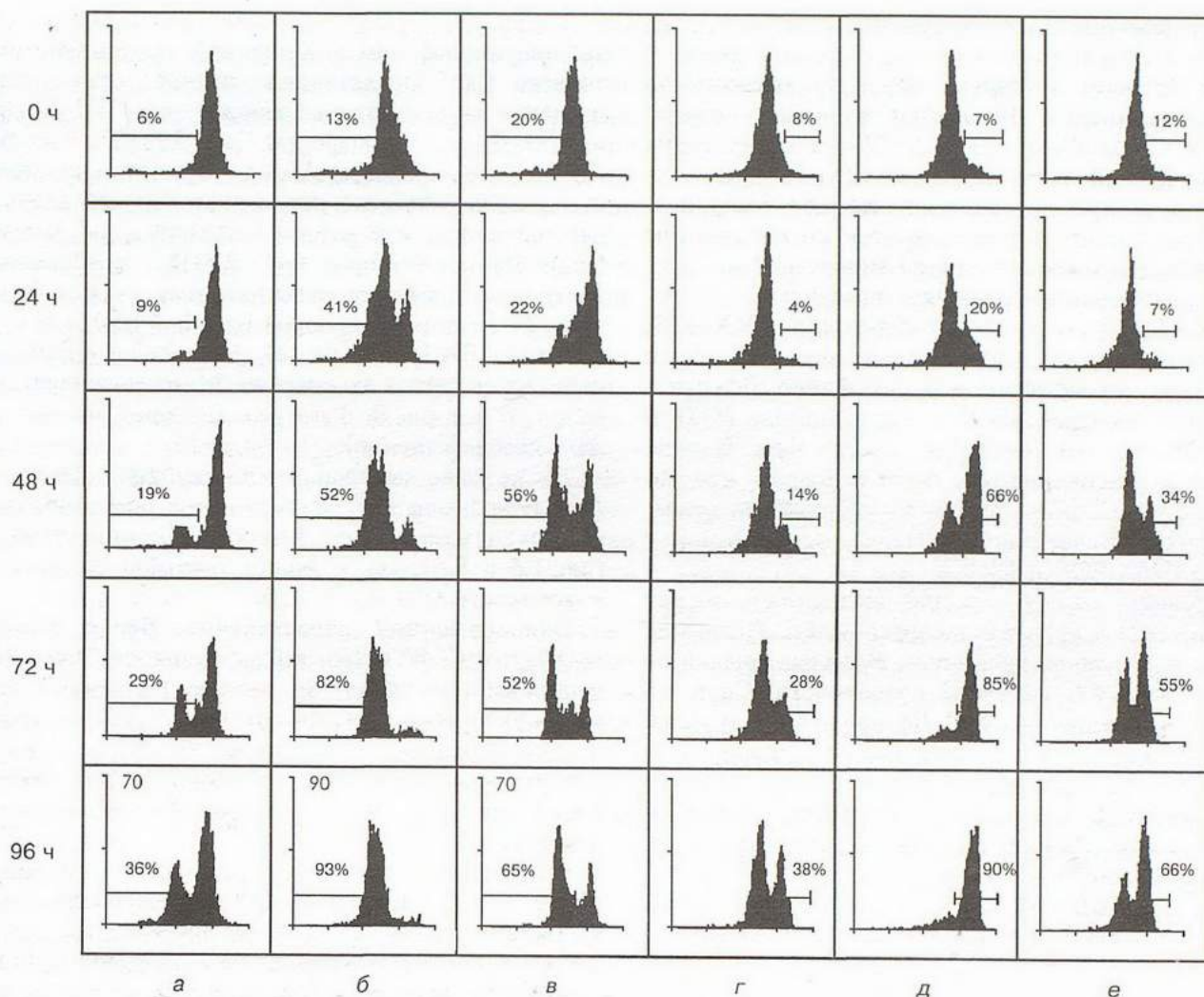


Рис.2. Цитофлуорограмма величины митохондриального потенциала и экспрессии фосфатидилсерина на лимфоцитах больных АБА.

жение величины МП Лф происходило после 48 ч инкубации (рис.1,а, 2,а), экспрессия молекул ФС на поверхности происходила в это же время (рис.1,г, 2,г). Показатели FSC и SSC у основной популяции Лф изменялись после 72 ч инкубации. Достоверное увеличение уровня фрагментация ДНК Лф началось также спустя 72 ч инкубации.

Таким образом, снижение величины МП и появление ФС на поверхности Лф происходят в первую очередь и практически одновременно. Таким же образом изменения плотности и размеров клеток, (оцениваемое по показателям FSC и SSC соответственно) и фрагментация ДНК Лф также начинались в сопоставимые друг с другом сроки.

Вышеуказанные признаки ПКГ наблюдались как у Лф доноров, так и больных АБА. Различий в спонтанном изменении показателей МП (см.рис.1,а, 2,а) и ФС (см. рис.1,г, 2,г) между исследуемыми группами не было выявлено. Несмотря на отсутствие различий в изменении величины МП и экспрессии ФС на поверхности Лф исследуемых групп, было показано, что фрагментация Лф больных АБА при 96-часовой инкубации была выражена в меньшей степени по сравнению с контролем (рис.3,а). Аналогичная тенденция

сохранялась и в дальнейшем. Процесс фрагментации ДНК коррелировал с изменением показателей светорассеивания в течение всего периода инкубации.

Инкубация Лф с Дн индуцировала в них вышеперечисленные изменения. Однако их динамика существенно различалась между Лф исследуемых групп.

Показано, что инкубация Лф с Дн дозозависимо приводила к снижению величины МП (рис.1, а и в, рис.2, а и в). Дн в одинаковой степени снижал величину МП у Лф доноров и больных АБА только при 24-часовой инкубации. Однако через 48 ч инкубации Лф с Дн количество клеток со сниженным МП среди Лф больных АБА было выше по сравнению с Лф доноров. Аналогичная тенденция сохранялась и в дальнейшем (рис.1,в и 2,в). Следует также отметить тот факт, что при инкубации Лф как доноров, так и больных АБА с Дн происходило снижение величины МП только у определенной части клеток, в то время как у остальных Лф величина МП не изменялась.

Инкубация Лф с Дн также приводила к достоверному повышению уровня экспрессии ФС на их поверхности после 48 ч инкубации (рис.1, г и е, рис.2, г и е). Также было выявлено, что количество ФС⁺-Лф после их инкубации с Дн было существенно выше

среди Лф больных АБА по сравнению с контролем (рис.2,е и 1,е соответственно).

Таким образом, выявлена обратная зависимость между спонтанным и Дн-индуцированным изменением МП и появлением молекул ФС на поверхности Лф. Полученный факт позволил сделать предположение, что экспрессия ФС на клеточной поверхности Лф происходит только у клеток со сниженным МП. Для подтверждения данной гипотезы было проведено одновременное измерение вышеуказанных показателей. Для этого вместо флюорохрома CMX-ROS, использованного для оценки величины МП, было произведено одновременное окрашивание Лф с помощью флюорохрома DiOC₆ (для оценки МП) и MC540 (для оценки уровня экспрессии ФС). В предварительных экспериментах было показано, что инкубация Лф с CLCCP приводит в одинаковой степени к снижению величины МП Лф, оцениваемой с помощью CMX-ROS и DiOC₆.

Обнаружена четкая обратная зависимость между величиной МП и уровнем экспрессии ФС. Показано, что Лф с нормальной величиной МП практически не экспрессируют ФС на своей поверхности. Спонтанное снижение величины МП Лф предшествует появлению ФС на клеточной поверхности. Более того, экспрессия ФС появляется только на клетках со сниженным МП. Аналогичные изменения наблюдались и в случае Дн-индуцированного апоптоза Лф.

Дн также индуцировал фрагментацию ДНК Лф после 72 ч инкубации. Количество клеток, в которых наблюдалась упорядоченная фрагментация ДНК, было достоверно выше среди Лф больных АБА по сравнению с Лф доноров (см. рис.3). Аналогичное различие в изменении этого показателя апоптоза между Лф исследуемых групп отмечалось при 96 и 120 ч инкубации Лф с Дн.

Учитывая важную роль ионов Ca²⁺ в регуляции ПКГ и значительные сходства, касающиеся измене-

ний ядра, при ГК-индуцированным апоптозе и апоптозе, индуцированном повышением уровня внутриклеточного Ca²⁺, представляло интерес сравнительное изучение вышеуказанных параметров ПКГ Лф после их инкубации с ионофором Ca²⁺ A23187. Инкубация Лф доноров и больных АБА с данным препаратом индуцировала в той же последовательности все вышеперечисленные изменения. Было показано, что инкубация Лф с ионофором Ca²⁺ A23187 по сравнению с Дн приводит к более значительному снижению величины МП как у Лф доноров (рис.1, б и в), так и у Лф больных АБА (рис.2, б и в). Аналогичные изменения касались и уровня экспрессии ФС на поверхности Лф (рис.1, д и е, рис.2, д и е для Лф доноров и больных АБА соответственно).

Также было выявлено, что инкубация Лф больных АБА ионофором Ca²⁺ индуцирует в большей степени по сравнению с Лф доноров как снижение МП (рис.1,б и 2,б), так и экспрессию ФС на клеточной поверхности (рис.1,д и 2,д).

Одновременное окрашивание Лф с помощью DiOC₆ и MC540 также выявило аналогичную Дн-индуцированному апоптозу четкую обратную зависимость экспрессии ФС на поверхности Лф и уровнем их МП. Показано, что экспрессия ФС на наружной поверхности цитоплазматической мембраны Лф наблюдается только среди клеток со сниженным уровнем МП.

Инкубация Лф с ионофором Ca²⁺ индуцировала также и фрагментацию ДНК. Количество гиподиплоидных клеток среди Лф после их инкубации с препаратом было существенно выше по сравнению с Дн-индуцированным апоптозом (рис.3, б и в), но тем не менее было одинаковым в обеих исследуемых группах.

Таким образом, снижение величины МП Лф с использованием различных индукторов апоптоза свидетельствует об обязательном участии митохондрий в процессах ПКГ Лф. Первичное изменение данного показателя при апоптозе, вызванном Дн и ионофором Ca²⁺, свидетельствует о том, что снижение величины МП является самым ранним признаком апоптоза Лф, индуцирующим ряд других проявлений апоптоза.

Подтверждением данного предположения являются эксперименты с использованием вещества, специфически снижающего МП — CLCCP. Показано, что инкубация Лф доноров и больных АБА с CLCCP дозависимо снижала величину их МП, а экспрессия ФС происходила позже и находилась в обратной зависимости от МП в течение всего срока инкубации.

Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют, что изменение величины МП Лф является самым ранним и обязательным признаком спонтанного и индуцированного различными факторами апоптоза Лф доноров и больных АБА. Инкубация Лф с ионофором Ca²⁺ A23187 и Дн приводила в первую очередь к

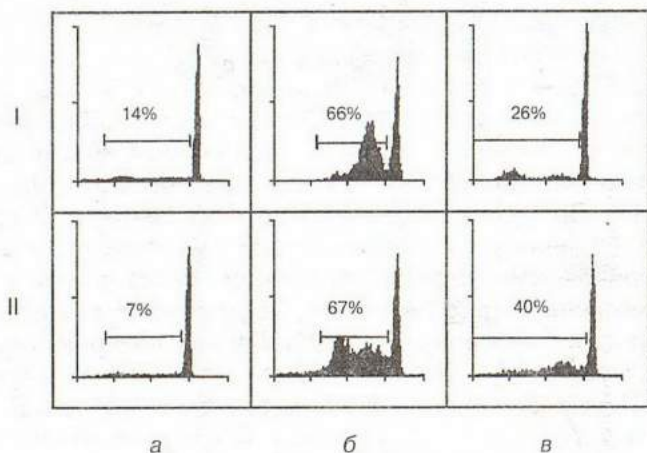


Рис.3. Спонтанная и индуцированная фрагментация ДНК на 96 ч инкубации.

I — Лф донора, II — Лф больного АБА; а — контроль, б — инкубация с A23187 (2 мкМ), в — инкубация с Дн (10⁻⁴М).

снижению величины МП и последующей экспрессии ФС и фрагментации ДНК. Более того, целенаправленное снижение МП с помощью CLCCP также дозозависимо индуцировало последующую экспрессию ФС на поверхности Лф. Следовательно, логично предположить, что БАВ, выделяющиеся из митохондрий после снижения их МП, могут участвовать как в деградации ДНК (см. выше), так и создавать предпосылки для последующей элиминации клеток, подвергающихся апоптотической гибели посредством усиления экспрессии специфических молекул (см. выше) на их поверхности. В частности, можно предположить, что вышеуказанные БАВ могут активировать ФС-транслоказы или оказывать протеолиз компонентов цитоскелета (например, фодрина), удерживающих ФС на внутренней поверхности мембраны. Известно, что протеолиз фодрина инициирует транслокацию ФС на наружную поверхность клетки [12]. Участие митохондрий в апоптозе и последующей элиминации апоптотирующих клеток подтверждают и другие исследователи. Например, показано, что блокада митохондриальной АТФ-азы индуцирует экспрессию ФС на поверхности Лф [4]. Высвобождение из митохондрий большинства БАВ, участвующих в регуляции ПКГ, сопряжено со снижением величины их МП, поэтому блокирование этого процесса способно предотвратить большинство характерных признаков апоптоза. Например, показано, что преинкубация тимоцитов с веществами, препятствующими снижению величины их МП, одновременно предотвращает появление на поверхности клеток молекул ФС [4] и фрагментацию ДНК в ответ на различные стимулы [22]. К сожалению, использование веществ, предотвращающих снижение величины МП, при изучении индуцированного апоптоза Лф периферической крови является неприемлемым из-за кратковременности их действия (30–60 мин) [23].

Известно, что в митохондриях содержатся белки (bcl-2, bcl-x, bcl-xL и др.), регулирующие процессы ПКГ. Одной из точек приложения в функционировании данных белков является контроль за высвобождением вышеперечисленных БАВ из митохондрий. Обнаружено, что высвобождение из митохондрий ряда апоптогенных факторов, в частности цитохрома c, блокируется гиперэкспрессией белка bcl-2 [21]. Также показано, что уровень экспрессии в клетках этих белков при различных патологических состояниях может изменяться и оказывать существенное влияние на их течение. Например, показано, что экспрессия белка bcl-2, являющегося продуктом одноименного протоонкогена в Лф, полученных из бронхоальвеолярного лаважа больных АБА со средней и тяжелой степенью заболевания, оказывается повышенной, в то время как у Лф доноров и больных АБА с легкой степенью тяжести заболевания не отличается друг от друга [17].

Следовательно, функциональное состояние митохондрий и их способность реагировать на апоптотические сигналы выделением различных БАВ опреде-

ляет характер воспаления, а следовательно, и повреждения бронхиального дерева при АБА.

Учитывая высокую эффективность ГК, используемых в терапии АБА, было проведено изучение их влияния на ПКГ Лф доноров и АБА.

Показано, что несмотря на "устойчивость" Лф больных АБА к процессам спонтанного апоптоза, проявляющегося в замедлении фрагментации их ДНК, данные клетки являются более "чувствительными" к Дн-индуцированному апоптозу, что проявляется в увеличении количества клеток с признаками упорядоченной фрагментации ДНК по сравнению с контролем (рис.3,б). Аналогичным образом Дн-индуцированное снижение величины МП наблюдается в большей степени среди Лф больных АБА. Эти данные свидетельствуют о том, что способность Дн вызывать фрагментацию ДНК Лф обусловлена не только активацией группы эндонуклеаз, как это указывают литературные данные (см. выше). Дн-индуцированный апоптоз Лф является митохондриаль-опосредованным. Повышенная чувствительность Лф больных АБА к разнообразным индукторам апоптоза (например, Дн и ионофору Ca^{2+}) может быть обусловлена "гиперреактивностью" митохондрий данных клеток. Это в свою очередь приводит к большему снижению (по сравнению с контролем) величины их МП, сопровождающейся выбросом в цитоплазму различных апоптогенных факторов, способных запускать каскад последовательных реакций, приводящих в конечном счете к упорядоченной деградации ДНК и экспрессии ФС на поверхности Лф, "обеспечивающих" соответственно их гибель по механизму апоптоза и элиминацию.

Нельзя исключить тот факт, что повышенная чувствительность Лф больных АБА по сравнению с контролем к Дн-индуцированному апоптозу может быть обусловлена их предварительной активацией. Известно, что предварительно активированные клетки, в том числе и Лф, способны подвергаться апоптозу при повторном действии активационного стимула [1,24]. Этому способствует, например, одновременное появление на поверхности Т-Лф *Fas*-рецептора и его лиганда (*FasL*), запускающих программу их клеточной гибели [8]. Активация Лф при АБА, возможно, делает их более чувствительными к Дн-индуцированному пути запуска программированной клеточной гибели.

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. Caron-Leslie L.-A., Evans R.B., Cidlowski J.A. Bcl-2 inhibits glucocorticoid-induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cycloheximide-regulated apoptosis in S49 cells. FASEB J. 1994; 8: 639–645.

4. 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.
5. Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassilli E. et al. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 323-330.
6. Jacobson M.D., Burne M.P., King T. et al. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361: 365-369.
7. Kodama T., Matsuyama T., Miwata S. et al. Late and prolonged induction of eosinophil apoptosis in sensitized mouse lung after ovalbumin challenge. *Clin. Exp. Allergy* 1998; 28: 1435-1443.
8. Krammer P.H. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 1999; 71: 163-210.
9. Kroemer G., Zamzani N., Susin S. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 1997; 18 (1): 44-51.
10. 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.
11. Macho A., Decandin D., Castedo M. et al. Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry.* 1996; 25: 333-340.
12. Martin S.J., Brein C.A., Nishioka W.K. et al. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6425.
13. Meaher L., Cousin J., Seckl J., Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J. Immunol.* 1996; 156: 4422-4428.
14. Metzger W.J., Zavala D., Richerson H. et al. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatics lung: description of model and local inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 135: 433-440.
15. Mower D.A., Jr., Peckhman D.W., Illera V.A. et al. Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J. Immunol.* 1994; 152: 4832-4842.
16. Nicoletti I., Migliorati G. Rapid and simple method of measurement of nuclear apoptosis. *J. Immunol. Meth.* 1991; 139: 271-279.
17. Panagou P., Karameris S., Tspira S. et al. BCL-2 expression in asthma: Analysis of sputum induction samples. In: Abstracts of Annual Congress of European respiratory society. Berlin; 1997. P2066.
18. Petit P.X., LeCocuer H., Zorn E. et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* 1995; 130: 157-167.
19. 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.
20. Walsh G.H., Dewson G., Wardlaw A.J. et al. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J. Immunol. Meth.* 1998; 217 (1-2): 153-163.
21. Wesselborg S., Janssen O., Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting blood cells. *J. Immunol.* 1993; 150: 4338-4345.
22. Xin-le Cui, Yuan-Jue Zhu, Zi-Jian Guo et al. Aerosol administration of dexamethasone and methotrexate attenuated the reaction of eosinophil infiltration of the lung in ovalbumin sensitized mice. In: Abstracts of Annual Congress of European respiratory society. Berlin; 1997. P0430.
23. Yang J., Bhalla K., Kim C.N. et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129.
24. 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; 182: 1661-1672.
25. Zamzani N., Susin P., Marchetti P. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Ibid.* 1996; 183: 1533-1547.

Поступила 03.05.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.24-036.12-07:616.745.6-092

А.Р.Гайнутдинов, Г.А.Иваничев, З.Р.Лыцова

РЕФЛЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЖРЕБЕРНЫХ МЫШЦ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Казанская государственная медицинская академия

REFLEX ACTIVITY OF INTERCOSTAL MUSCLES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES

A.R.Gainutdinov, G.A.Ivanichev, Z.R.Lystsova

Summary

The lung function, the contractile ability of the diaphragm, spinal and spino-bulbo-spinal reflexes of intercostal muscles were investigated in 97 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Disturbances of the reflex activity of spinal and supraspinal structures of the breathing neuromotor system were determined under a high bronchial resistance and the diaphragm weakness.

Резюме

У 97 больных хроническими обструктивными заболеваниями легких мы изучали функцию внешнего дыхания, сократительную способность диафрагмы, а также спинальные и спинобульбоспинальные