

Д.Б.Утешев, А.А.Карабиненко, П.С.Прокофьев, Г.И.Сторожаков

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОАСТМАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МОНОНУКЛЕАРОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Российский государственный медицинский университет, Москва

EFFECTS OF SOME DRUGS USED FOR TREATMENT OF BRONCHIAL ASTHMA ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF HUMAN MONONUCLEAR CELLS *IN VITRO*

D.Uteshev, A.Karabinenko, P.Prokofiev, G.Storazhakov

Summary

Effects *in vitro* of salbutamol, theophylline, budesonide, cromoglicic acid and β -carotene in their therapeutic concentrations on spontaneous and PHA-induced proliferation and apoptosis of mononuclear cells (MNC) were studied. β -carotene and budesonide decreased $[3H]$ -TdR incorporation in PHA-stimulated MNC. On the other hand, salbutamol, theophylline and cromoglicic acid did not effect on $[3H]$ -TdR incorporation in PHA-stimulated MNC. β -carotene also enhanced the apoptosis of MNC but the other tested drugs did not influence on it. Thus, β -carotene has a strong anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human MNC. These results suggest that β -carotene could be as useful as corticosteroids for reduction of MNC functional activity causing the inflammation in bronchial asthma.

Резюме

При исследовании влияния противоастматических препаратов (сальбутамола, кромогликата натрия, будесонида и теофиллина), а также иммуномодулятора β -каротина на пролиферативный ответ и апоптоз мононуклеаров периферической крови (МНПК) человека *in vitro* наблюдалось выраженное снижение индекса стимуляции под влиянием β -каротина и будесонида. Остальные из исследуемых нами препаратов не оказывали влияния на пролиферацию МНПК. Под действием бета-каротина наблюдалось увеличение процента клеток, находящихся в апоптозе, с 41% в контроле до 51% ($p < 0,05$). Другие из исследованных нами препаратов не влияли на апоптоз МНПК. Таким образом, установленное нами свойство β -каротина угнетать пролиферацию и усиливать апоптоз МНПК — клеток-мишеней при бронхиальной астме — позволяет обосновать его эффективность в клинической практике в качестве препарата, обладающего возможным действием на аллергическое воспаление бронхов.

По современным представлениям ключевым звеном патогенеза бронхиальной астмы является гиперреактивность бронхов к различным раздражителям, проявляющаяся периодическими приступами бронхоспазма [1,4]. Считается, что одной из основных причин повышения чувствительности бронхов к раздражителям является их воспаление и синтез IgE.

Важную роль в этом процессе играют Т- и В-лимфоциты и антигенпредставляющие макрофаги за счет высвобождения ряда цитокинов [2]. Физиологически обоснованные подходы к лечению бронхиальной астмы включают лекарственную терапию, направленную на расслабление гладкой мускулатуры (бронходилататоры) и подавление воспаления бронхов (противовоспалительные препараты). К наиболее широко применяемым бронходилататорам относятся β -адренергические препараты и ингибиторы фосфодиэстеразы (теофиллин), которые купируют спазм бронхов, но не влияют на аллергическое воспаление дыхательных путей. Проти-

вовоспалительные препараты, применяющиеся в лечении бронхиальной астмы, включают кортикостероиды и кромогликат натрия. Кортикостероиды блокируют высвобождение медиаторов воспаления из эффекторных клеток и прерывают цитокинопосредованные межклеточные реакции. Точный механизм действия кромогликата натрия остается не установленным [1]. В последнее время усилился интерес к применению β -каротина в составе различных комплексных препаратов для лечения бронхиальной астмы [5]. Считается, что в основе его фармакологического действия лежат иммуномодулирующие свойства [3].

В формировании и разрешении воспалительных реакций принимают участие процессы пролиферации и апоптоза. Попытки использовать антипролиферативные препараты (цитостатики) для лечения бронхиальной астмы не оправдали возлагавшихся на них надежд. Возможности фармакологического воздействия на апоптоз при бронхиальной астме до настоящего времени

практически не исследованы. Целью настоящей работы явилось изучение влияния противоастматических препаратов (будесонид, интал, теофиллин и сальбутамол), а также иммуномодулятора бета-каротина в терапевтических концентрациях на пролиферативный ответ и апоптоз мононуклеаров периферической крови человека *in vitro*.

Материалом для исследования служила кровь 20 здоровых доноров. Мононуклеары периферической крови (МНПК) выделяли из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла-верографина (плотность — 1,077) с помощью центрифугирования при комнатной температуре в течение 30 мин при 400 g. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 ("Flow") с добавлением 2 mM L-глутамина и 10% термоинактивированной сыворотки эмбрионов телят ("Calbiochem"). Для индукции апоптоза МНПК в количестве 10^5 на лунку помещали в 96-луночные планшеты ("Nunc"). С целью активации клеток использовали фитогемагглютинин (ФГА, "Serva") в конечной концентрации 10 мкг/мл. Культивирование МНПК проводили в течение 72 час при 37°C и 5% CO₂ со следующими препаратами: β-каротин в концентрации 10^{-6} М (бета-каротин 0,05% в растительном масле "Валетек"), сальбутамол 10^{-9} М; будесонид 10^{-9} М; теофиллин 10^{-6} М, кромогликат натрия 10^{-6} М (Интал, "Rhone-Poulenc Rorer"). Во всех соответствующих контрольных образцах МНПК использованы растворители в тех же конечных концентрациях, в которых они содержались в опытных образцах клеток, находящихся в присутствии испытуемых лекарственных препаратов. Затем МНПК отбирали, помещали в пробирки и центрифугировали. Клетки, находящиеся в осадке, фиксировали 70% этиловым спиртом в течение 1 часа. Спирт удаляли центрифугированием, клетки окрашивали в течение 1 часа иодитом пропидия ("Sigma") в концентрации 5 мкг/мл в PBS, содержащем 0,1% раствор Тритона X-100 и 0,1% цитрата Na. Процент клеток в апоптозе и с диплоидным набором хромосом определяли на проточном цитофлуорометре ("Facs Scan", Becton Dickinson).

Для оценки пролиферативной активности МНПК за 18 часов до окончания культивирования во все лунки добавляли по 40 кБк ³H-тимидина. Затем клетки собирали на фильтры с помощью аппарата "Харвестер" ("Titertec"). Включение ³H-тимидина определяли на β-счетчике "β-Тгас". Каждую пробу тоекратно воспроизводили.

Оценка включения ³H-тимидина. Эффекты оценивали как в абсолютных величинах (количество импульсов в мин), так и путем вычисления индексов стимуляции (ИС), определяемых отношением включения ³H-тимидина в опытных образцах к его включению в контрольных образцах.

$$ИС = \frac{\text{количество имп. в мин. в опыте}}{\text{количество имп. в мин. в контроле}}$$

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия. При обработке результатов использовали пакет статистических программ "MS Excel 7.0"

Таблица 1

Влияние препаратов на спонтанную и ФГА-индуцированную пролиферацию МНПК *in vitro*

Препарат	Спонтанная пролиферация	ФГА-индуцированная
	Включение ³ H-тимидина (имп/мин)	
Контроль	1821±239	23511±4895
β-каротин, 10^{-6} М	2001±270	3912±1249*
Сальбутамол, 10^{-9} М	2264±364	30035±6092
Будесонид, 10^{-9} М	2086±284	7180±1279*
Теофиллин, 10^{-5} М	1598±232	26818±5216
Интал, 10^{-6} М	1947±325	28741±5643

Примечание. * — $p < 0,001$.

Результаты изучения действия препаратов на пролиферацию представлены в табл.1.

Анализ полученных данных показывает, что исследуемые препараты не оказывают влияния на уровень спонтанной пролиферации МНПК. При оценке эффекта на ФГА-индуцированный пролиферативный ответ клеток было отмечено, что β-каротин в концентрации 10^{-6} М и будесонид в концентрации 10^{-9} М давали выраженный антипролиферативный эффект. Было отмечено, что влияние β-каротина на пролиферацию отмечалось только при его использовании в концентрации 10^{-6} М. Сведения об индексах стимуляции представлены в табл.2. Средний индекс стимуляции (ИС) при стимуляции клеток ФГА составил 12,9. Под влиянием β-каротина наблюдалось более чем шестикратное снижение ИС, будесонид вызывал его снижение в 4 раза относительно положительного контроля (ФГА). Таким образом, было установлено, что такие противоастматические препараты, как сальбутамол, теофиллин и интал в терапевтических концентрациях не оказывают влияния на пролиферацию МНПК.

Хорошо известно, что активированные МНПК инициируют и поддерживают аллергическое воспаление в дыхательных путях, и как следствие, прямо участвуют в патологических изменениях, приводящих к обострению бронхиальной астмы [3,6]. Разнообразие клеточного

Таблица 2

Влияние препаратов на индексы стимуляции МНПК *in vitro*

Группы	ИС относительно контрольных проб при действии различных препаратов
ФГА	12,9
β-каротин, 10^{-6} М	2,1
Сальбутамол, 10^{-9} М	16,5
Будесонид, 10^{-9} М	3,9
Теофиллин, 10^{-5} М	14,7
Интал, 10^{-6} М	15,8

представительства β_2 -адренорецепторов предполагает довольно широкий спектр контролирующего действия агонистов этих рецепторов на функцию клеток, участвующих в воспалении при бронхиальной астме, в том числе МНПК [4]. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о возможном действии агонистов β_2 -адренорецепторов на процессы аллергического воспаления при бронхиальной астме. Однако результаты клинических исследований свидетельствуют скорее об обратном. Таким образом, вполне обоснованной является точка зрения о том, что одними агонистами β_2 -адренорецепторов не может быть достигнуто эффективное торможение аллергического воспаления [1]. Расхождение данных, полученных в условиях клинических испытаний и в экспериментальных исследованиях, объясняется скорее всего тем, что в последнем случае были использованы очень высокие дозы β -агонистов по сравнению с обычными терапевтическими.

Соединениями, которые могут обладать разнообразной противоаллергической активностью, являются препараты из группы ингибиторов фосфодиэстеразы (теофиллин). Этим обстоятельством, в частности, объясняется возросший интерес к изучению противоаллергического действия теофиллина [2]. В ряде экспериментальных работ было описано свойство препарата *in vitro* оказывать прямое действие на функцию Т-лимфоцитов, в том числе было показано, что теофиллин в концентрациях, близких к терапевтическим, тормозит активность естественных киллеров [1]. Однако в других исследованиях, в том числе и клинических, не было отмечено выраженного противовоспалительного действия теофиллина. Было высказано мнение о том, что противоастматическое действие препарата, вероятнее всего, связано с его бронхолитическим действием [1,4]. Результаты нашего исследования, свидетельствующие об отсутствии у теофиллина выраженной антипролиферативной активности МНПК, также согласуются с этой точкой зрения.

Было показано, что действие кромогликата натрия распространяется на различные типы клеток, участвующие в аллергическом воспалении, в том числе и на тучные клетки слизистой оболочки бронхов и моноци-

ты [1,4]. Однако в нашем исследовании этот препарат в терапевтических концентрациях не оказывал влияния ни на спонтанную, ни на ФГА-индуцированную пролиферацию МНПК.

Глюкокортикостероиды являются наиболее эффективными противоаллергическими и противовоспалительными средствами. За последние десятилетия их широкого клинического применения и изучения в эксперименте накоплен необычайно большой опыт. Общеизвестной является точка зрения об эффективном подавлении кортикостероидами пролиферации Т-лимфоцитов как *in vivo*, так и *in vitro* [1]. Данные настоящего исследования подтверждают этот широко известный факт: нами было отмечено четырехкратное снижение индекса стимуляции пролиферации МНПК при инкубации клеток с будесонидом.

Интересные результаты были получены при исследовании влияния β -каротина на пролиферацию МНПК. Было установлено, что препарат в концентрации 10^{-6} М эффективно угнетает пролиферацию МНПК человека (индекс стимуляции клеток снижается более чем в 6 раз). Следует отметить, что действие β -каротина на Т-клеточное звено иммунного ответа является недостаточно изученным. Имеются данные, свидетельствующие как о стимуляции, так и о торможении активности Т-клеток под влиянием β -каротина [3].

В отношении молекулярных механизмов биологического действия β -каротина также не существует единого мнения [3]. Ряд исследователей считает, что эффект препарата реализуется за счет его превращения в активный метаболит — витамин А. Допускается также, что β -каротин может действовать через ретиноевую кислоту. В последнее время высказывается мнение о том, что действие β -каротина на иммунокомпетентные клетки носит самостоятельный, а не опосредованный через метаболиты характер [6].

Таким образом, при исследовании влияния антиастматических препаратов на пролиферативный ответ МНПК было отмечено, что сальбутамол, теофиллин и кромолин натрия в терапевтических концентрациях не оказывают влияния на активность клеток. Действие будесонида выражается в четырехкратном уменьшении индекса стимуляции. Антипролиферативная активность β -каротина оказалась даже выше, чем у этого “эталонного” препарата. Действие препарата наблюдалось при концентрации, эквивалентной однократному приему человеком 2,5 мг β -каротина. Установленное нами свойство β -каротина оказывать выраженный антипролиферативный эффект на МНПК — клетки-мишени при бронхиальной астме, позволяет рекомендовать его для клинического применения в качестве препарата для лечения аллергического воспаления бронхов.

Результаты исследования апоптоза представлены в табл.3 и 4. Анализ полученных данных показывает, что исследуемые “классические” антиастматические препараты (будесонид, интал, теофиллин и сальбутамол) не оказывали влияния на апоптоз МНПК. Однако β -каротин в концентрации 10^{-6} М существенно повышал процент клеток, находящихся в апоптозе, и более чем в два раза снижал количество клеток с диплоидным

Таблица 3

Влияние лекарственных веществ на апоптоз периферических мононуклеаров человека *in vitro*

Лекарственное вещество, концентрация	% апоптотирующих клеток
Контроль (ФГА)	41,48±3,72
β -каротин, 10^{-6} М	51,09±5,96*
Сальбутамол, 10^{-9} М	44,47±3,56
Будесонид, 10^{-9} М	42,4±3,5
Теофиллин, 10^{-5} М	42,38±2,57
Интал, 10^{-6} М	42,79±1,99

Примечание. * — $p < 0,05$.

Таблица 4

Влияние лекарственных веществ на частоту появления периферических мононуклеаров человека с диплоидным набором хромосом *in vitro*

Лекарственное вещество, концентрация	% клеток с диплоидным набором хромосом
Контроль (ФГА)	40,75±5,07
β-каротин, 10 ⁻⁶ М	19,07±2,04*
Сальбутамол, 10 ⁻⁹ М	43,43±2,34
Будесонид, 10 ⁻⁹ М	38,38±2,92
Теофиллин, 10 ⁻⁵ М	40,35±3,64
Интал, 10 ⁻⁶ М	41,69±1,87

Примечание. * — $p < 0,001$.

набором хромосом. Накопленные к настоящему времени данные о роли нарушений апоптоза в патогенезе аллергических реакций при развитии бронхиальной астмы немногочисленны и отрывочны. Эти данные касаются преимущественно эозинофилов и в меньшей степени нейтрофилов, базофилов и Т-лимфоцитов [1,2]. Иммунофлюоресцентный анализ поверхностных антигенов Т-лимфоцитов у больных бронхиальной астмой показал, что при этом заболевании повышается относительное содержание периферических CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов. Эти изменения сопровождались сниженной экспрессией Fas-рецептора клеток [1]. Известно, что Fas/Apo-1 — рецептор Т-лимфоцитов после взаимодействия с лигандом индуцирует запрограммированную клеточную гибель. Среди всех исследованных клеток Fas-лиганд обнаружен только на активированных клетках. Важная роль в нарушениях апоптоза Т-лимфоцитов принадлежит нарушенной регуляции Ca²⁺-зависимой протеинкиназы С. Относительно недавно было показано, что у больных бронхиальной астмой наблюдается повышение активности протеинкиназы С лимфоцитов за счет транслокации этого фермента из цитозоля в клеточную мембрану. Также было показано, что у больных бронхиальной астмой имеет место повышение фосфодиэстеразной активности лимфоцитов и снижение уровня сАМР [1]. Давно известно, что глюкокортикостероиды (ГКС), обладающие противоаллергическим и противовоспалительным действием, являются наиболее эффективными препаратами для базисного лечения бронхиальной астмы [4]. ГКС способны индуцировать апоптоз лимфоцитов за счет массивного выброса ионов Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума. Однако зрелые периферические Т-клетки полностью резистентны к глюкокортикоидиндуцированному апоптозу. Данные настоящего исследования подтверждают

этот факт: на модели ФГА-индуцированного апоптоза МНПК здоровых доноров нами не было отмечено усиления апоптоза при инкубации с будесонидом. Также не было отмечено усиления апоптоза и при инкубации клеток с сальбутамолом и теофиллином — препаратами, повышающими активность сАМР и ингибирующими действие фосфодиэстеразы лимфоцитов. Другой потенциально проапоптотический препарат — кромогликат натрия, ингибирующий активность протеинкиназы С лимфоцитов, не оказывал влияния на апоптоз МНПК здоровых доноров в нашем исследовании.

Представляют интерес результаты, полученные при исследовании влияния β-каротина на апоптоз МНПК. Было установлено, что препарат в концентрации 10⁻⁶ М эффективно усиливает апоптоз МНПК здоровых доноров и более чем в два раза снижает процент клеток с диплоидным набором хромосом. На клеточном уровне действие β-каротина реализуется через образование высокоактивных метаболитов: All-trans- (АТРА) и 9-цис-ретиноевые кислоты [6]. Было показано, что эти вещества способны усиливать апоптоз CD4⁺ CD8⁺ мышечных тимоцитов, при этом активность 9-цис-ретиноевой кислоты в 50 раз выше, чем у АТРА [3].

В заключение следует подчеркнуть, что на исследованной нами модели апоптоза МНПК использовались клетки, выделенные от здоровых доноров. На наш взгляд, именно этим и объясняется отсутствие проапоптотической активности у большинства используемых препаратов, потенциально способных в патологических условиях индуцировать апоптоз лимфоцитов. Однако выявленное нами свойство β-каротина усиливать апоптоз МНПК — клеток-мишеней при бронхиальной астме позволяет обосновать его эффективность в клинической практике в качестве препарата, обладающего возможным действием на аллергическое воспаление бронхов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. — М.: Фармарус Принт, 1998.
2. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Макаров А.И. Молекулярные механизмы IgE-опосредованной аллергии. — М.: РГМУ, 1996.
3. Утешев Д.Б., Сергеев А.В., Утешев Б.С. Анализ иммуномодулирующих свойств ретиноидов // Новости науки и техники: Информ. сборник. — 1998. — № 5. — С.1—10.
4. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма: глобальная стратегия // Тер. арх. — 1994. — № 3. — С.3—8.
5. Grievink L., Jansen S.M., van Veer P., Brunekreef B. Acute effects of ozone on pulmonary function of cyclists receiving antioxidant supplements // Occup. environm. Med. — 1998. — Vol.55. — P.113—117.
6. Nagy L., Thomazy V.A., Heyman P.A., Davies P.J.A. Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues // Cell Death Different. — 1998. — Vol.5, № 1. — P.4—11.

Поступила 12.02.99.