

ЛИТЕРАТУРА

1. Амануни В.Г., Казарян К.Г., Сафарян М.Д. // Тер. арх.— 1980.— № 3.— С.96—100.
2. Иванов А.С., Мольнар А.А., Березов А.Г., Халилов Э.М. Модификация проницаемости биологических и модельных мембран эфирами холестерина // Всесоюзный съезд патофизиологов "Нарушение механизмов регуляции и их коррекция", 4-й. Тезисы докладов.— Кишинев, 1989.— С.528.
3. Кокосов А.Н. Методика разгрузочно-диетической терапии и ее особенности у больных бронхиальной астмой.— Л., 1978.— С.17—26.
4. Лизенко М.В., Петровский В.И., Котенко Т.В., Реггеранд Т.И., Рипатти П.О. // Организация пульмонологической помощи взрослому населению и подросткам.— Л., 1991.— С.57—63.
5. Лизенко М.В., Петровский В.И., Давыдов С.А., Бахирев А.М. Исследование липидного состава сыворотки и липопротеидов крови с применением биохимических методов у больных бронхиальной астмой при лечебном голодании // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях.— Петрозаводск, 1993.— С.145—156.
6. Лизенко М.В. Особенности обмена липидов в сыворотке, липопротеидах и форменных элементах крови больных бронхиальной астмой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Петрозаводск, 1994.
7. Лизенко М.В., Петровский В.И., Доршакова Н.В., Бахирев А.М. // Медицина, направление II, программа "Университеты России" — М.: МГУ, 1994.— С.28—33.
8. Масуев И.А. Масуев К.А. Изменение липидного состава клеточных мембран у больных бронхиальной астмой под влиянием ГК-терапии // Клин. мед. 1991.— № 1.— С.86—88.
9. Минеев В.Н., Жихарев С.С., Карпов О.И., Яблонская В.Н. Особенности агрегации эритроцитов при различных формах бронхиальной астмы // Дифференциальная диагностика заболеваний легких / Под ред. А.Н. Кокосова, М.М. Ильковича.— Л., 1986.— С.41—45.
10. Минеев В.Н., Жихарев С.С., Карпов О.И., Яблонская В.Н. Особенности агрегации эритроцитов при различных формах бронхиальной астмы // Врач. дело.— 1989.— № 5.— С.92—94.
11. Минеев В.Н. Роль эритроцитов в патогенезе бронхиальной астмы — нетрадиционные аспекты // Тер. арх.— 1990.— № 12.— С.119—121.
12. Осинин С.Г., Кокосов А.Н. Разгрузочно-диетическая терапия как саногенный метод в реабилитации больных бронхиальной астмой // Пульмонология.— 1994.— № 1.— С.28—32.
13. Петровский В.И., Реггеранд Т.И., Лизенко Е.И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови // Лаб. дело.— 1986.— № 6.— С.339—341.
14. Разгрузочно-диетическая терапия бронхиальной астмы (Методические рекомендации).— Л., 1984.— С.3—6.
15. Реггеранд Т.И., Лизенко Е.И., Петровский В.И., Сидоров В.С. Выделение липопротеидов сыворотки человека методом осаждения и определение их липидного состава // Лаб. дело.— 1990.— № 4.— С.48—52.
16. Соколов Е.М., Заботнов В.И., Подачина С.В., Балуда М.В. Нарушение реологических свойств крови и липидно-фосфолипидного спектра мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом // Кардиология.— 1996.— № 9.— С.67—70.
17. Торховская Т.И., Артемова Л.Г., Ходжакулиев Б.Г. и др. // Бюлл. экспер. биол.— 1980.— № 6.— С.675—678.
18. Федосеев Г.Б., Емельянов А.В. Бронхиальная астма: трудные и нерешенные проблемы // Тер. арх.— 1991.— № 3.— С.74—77.
19. Халилов Э.М., Ли В.С., Азизова В.А., Саженин Г.И., Алилов М.Г., Арчаков А.И. Структурно-функциональный анализ мембран эритроцитов с различным содержанием холестерина // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 1.— С.81—87.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem.— 1957.— Vol.226, № 1.— P.497.
21. Frank P.B. Lipid exchange and transfer between biological lipid-protein structures // Prog. Lipid Res.— 1978.— Vol.17.— P.207—243.

Поступила 04.03.98.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 616.248-07:616.155.1-091.8

В.Н.Минеев, Т.М.Лалаева, В.Г.Скопичев

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Кафедра госпитальной терапии имени акад.М.В.Черноруцкого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад.И.П.Павлова, Физиологический институт им.А.А.Ухтомского Санкт-Петербургского государственного университета

PECULIARITIES OF ERYTHROCYTES CYTOSKELETON IN BRONCHIAL ASTHMA

V.N.Mineev, T.M.Lalaeva, V.G.Skopichev

Summary

The aim of this study was to reveal the peculiarities of erythrocytes skeleton content in bronchial asthma (BA) patients under the modulation of adrenergic agents. The cytoskeleton was studied in 5 healthy men and 13 patients with BA by modified *Chentsov's et al.* method (1982). The integral optic density was evaluated by imaging analyser of "Ista-Videotest" firm (Saint-Petersburg city). It was found that cytoskeleton proteins were decreased in BA especially in endogenous BA (enBA). The cytoskeleton proteins were decreased under the adrenalin influence in healthy men, in exogenous BA (exBA) and in enBA but they were increased under the β -adrenoblockers influence (Obsidan) in the same group except exBA which was characterized by the decreased cytoskeleton content. The

data obtained indicates cytoskeleton's peculiarities depending on BA variants and on a close relation between the erythrocytes adrenoreactive system and the cytoskeleton as well.

Резюме

С целью выявления особенностей распределения цитоскелета в эритроцитах при бронхиальной астме (БА) в условиях модуляции адренореактивной системы было обследовано 18 человек (5 практически здоровых лиц и 13 больных БА). Цитоскелет выявляли с помощью модифицированного метода Ю.С. Ченцова и соавт. (1982), определяли интегральную оптическую плотность на анализаторе изображений фирмы "Иста-Видеотест" (Санкт-Петербург). Обнаружено, что как при экзогенной БА (ЭкзБА), так и при эндогенной БА (ЭндБА) наблюдается снижение содержания цитоскелетных белков в эритроцитах, наиболее выраженное и существенное у больных ЭндБА. У здоровых лиц, у больных ЭкзБА и ЭндБА под влиянием адреналина происходит уменьшение цитоскелетных белков, а при воздействии β -адреноблокатора (обзидан) — их увеличение, за исключением больных ЭкзБА, у которых отмечается снижение цитоскелетных белков. Полученные данные свидетельствуют не только об особенностях распределения цитоскелета в эритроцитах больных с различными видами БА, но и указывают на тесную связь между адренореактивной системой эритроцита и его цитоскелетом.

Состояние цитоскелета и его роль при аллергической патологии, в том числе при бронхиальной астме (БА), до сих пор не изучены, несмотря на очевидную важность этого пострецепторного звена в трансдукции регуляторного сигнала, прежде всего в аденилатцикласной сигнальной системе, имеющей стратегическое значение в патогенезе БА. Известны экспериментальные данные о роли цитоскелета в организации и осуществлении адекватных адренергических стимулов с позиций влияния на латеральную подвижность рецепторных молекул [8].

Клинические исследования в этой области сдерживаются методическими трудностями, что заставило нас искать адекватный подход к исследованию цитоскелета, пригодный для клиницистов. Подобный подход был разработан нами ранее [6] и позволил выявить при БА суммарное снижение цитоскелетных белков, причем была использована эритроцитарная модель как вполне адекватная для исследований патогенеза этого заболевания [5].

Целью данного исследования явилось выявление особенностей распределения белков цитоскелета в эритроцитах в условиях модуляции адренореактивной системы.

Было обследовано 18 человек: 5 практически здоровых лиц, 13 больных БА, из них 7 больных экзогенной БА (ЭкзБА) и 6 больных эндогенной БА (ЭндБА) преимущественно с течением средней тяжести.

Для исследования цитоскелета эритроцитов в условиях модуляции адренореактивной системы *in vitro* брали из локтевой вены натощак кровь и в объеме 0,2 мл вносили в пробы. Применяли гидрохлорид адреналина и обзидан в эквимолярных конечных концентрациях 4×10^{-5} М, инкубировали 20 мин при температуре 37°C.

После инкубации из каждой пробы брали по 1 капле эритроцезвеси и готовили мазки. Цитоскелет выявляли с помощью метода Ю.С. Ченцова и соавт. [11] в нашей модификации, доказывающей возможность цитоспектрофотометрической оценки [9]. В качестве лизирующего агента для предварительной экстракции цитоскелета использовали тритон X-100 в сочетании с 4М глицерином в течение 1 мин, ополаскивали фосфатным буфером (рН 7,2), фиксировали 1,5% глютаровым альдегидом в течение 20 мин, ополаскивали дистиллированной водой.

Для протравки мазки помещали в 2,5% раствор железоммонийных квасцов на 20 мин при температуре 60°C, тщательно промывали дистиллированной водой и окрашивали железным гематоксилином в течение 20 мин при температуре 60°C, далее тщательно промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Полученные препараты оценивали, определяя интегральную оптическую плотность в относительных единицах в монохроматическом излучении с длиной волны 520 нм на приборе, любезно предоставленном фирмой "Иста-видео-тест" (Санкт-Петербург, директор В.Г.Пантелеев).

Кроме этого, проанализировано распределение клеток по классам в зависимости от содержания цитоскелетных белков под влиянием адреналина и обзидана.

Классы клеток характеризовались определенным интервалом оптической плотности (всего 9 классов) от 0—30 отн. ед. до 240—300 отн. ед.

Исходное распределение цитоскелетных белков согласно интегральной оптической плотности в обследо-

Т а б л и ц а

Содержание цитоскелетных белков в эритроцитах при действии адреналина и обзидана ($M \pm m$, усл. ед.)

	Адреналин	Обзидан	Обзидан + Адреналин
Практически здоровые лица (n=5)	-23,49±10,3	18,0±4,27	26,62±11,4
Больные ЭкзБА (n=7)	-27,36±3,2	-33,1±8,69 $p < 0,01$	-26,65±10,3 $p < 0,01$
Больные ЭндБА (n=6)	-29,9±6,3	23,0±9,83	-18,5±2,28 $p < 0,01$

Примечание. Значения p — в сравнении со здоровыми лицами, указаны только достоверные различия.

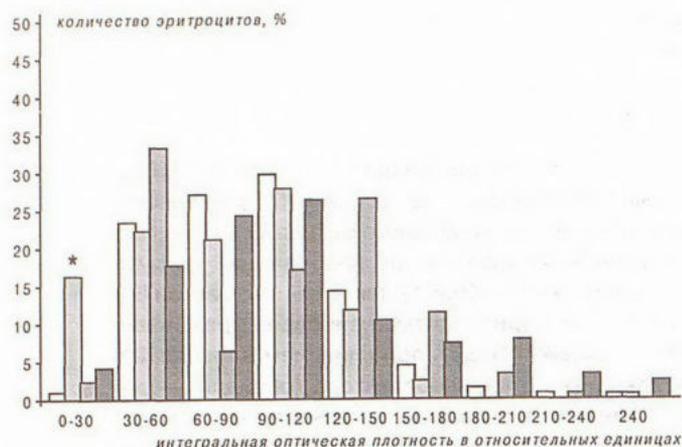


Рис. 1. Распределение эритроцитов по классам в зависимости от оптической плотности под влиянием адреналина и обзидана у практически здоровых лиц

1 — исходно, 2 — адреналин, 3 — обзидан, 4 — обзидан + адреналин.

ванных группах составило (в усл. ед): у практически здоровых лиц ($n=5$) $90,9 \pm 12,8$; у больных ЭкзБА $75,7 \pm 11,3$; у больных ЭндБА $59,2 \pm 6,8$ ($p < 0,05$ по сравнению со здоровыми).

Таким образом, в обеих группах наблюдается снижение содержания в эритроцитах цитоскелетных белков, наиболее выраженное и существенное у больных Энд БА. Аналогичный факт снижения цитоскелетных белков при БА выявлен нами ранее [6].

Результаты оценки влияния адреналина и обзидана на содержание цитоскелетных белков приведены в табл.1.

Из табл.1 видно, что у здоровых лиц, у больных ЭкзБА и ЭндБА под влиянием адреналина происходит уменьшение цитоскелетных белков, а при воздействии β -адреноблокатора (обзидана) — их увеличение, за исключением группы больных ЭкзБА.

Необходимо понять, каким образом адреналин и обзидан индуцируют выявленные нами изменения цитоскелетных белков, представленных в эритроците человека преимущественно спектрин-актиновой сетью. Известно, что актин цитоскелета эритроцитов не существует в виде отдельных глобул, а образует микрофиламенты, в состав которых входит и ряд белков цитоскелета (белки полос 4.1. и 4.9), регулирующих полимеризацию актина [2].

Микрофиламенты и микротрубочки представляют собой сократительный аппарат клетки. Известно до 12 белковых зон цитоскелета с молекулярной массой от 85 до 240 Кда в зависимости от подвижности в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Главными компонентами цитоскелета являются такие белки, как спектрин, актин, белок полосы 4.1, 4.9, анкирин, гликофорин С, расположенные на цитоплазматической стороне мембраны эритроцита и связанные с ней через интегральные белки. Эта система находится в динамическом состоянии в силу способности актина к обратимой ассоциации-диссоциации под влиянием различных факторов и прежде всего Ca^{2+} [2]. Ca^{2+} вызывает диссоциацию (деполимеризацию) микротру-

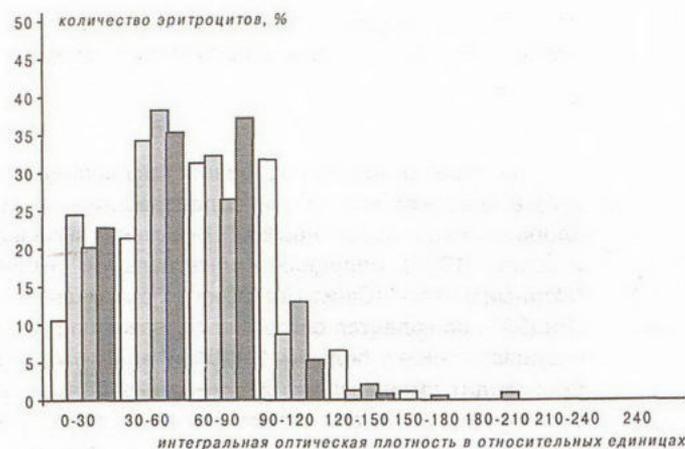


Рис.2. Распределение эритроцитов по классам в зависимости от оптической плотности под влиянием адреналина и обзидана у больных ЭкзБА

1 — исходно, 2 — адреналин, 3 — обзидан, 4 — обзидан+адреналин

бочек, которые образуются за счет форфорилирования тубулина специфическими протеинкиназами [2]. Однако в эритроцитах отсутствуют микротрубочки, но хорошо представлены микрофиламенты. Можно предположить, что Ca^{2+} вызывает аналогичную диссоциацию микрофиламентов в эритроцитах, принимая во внимание тот факт, что обе системы представляют сократительный аппарат клетки. Таким образом, механизм индуцирования адреналином изменений спектрин-актиновой сети можно представить следующим образом.

Адреналин усиливает ток Ca^{2+} в эритроциты, взаимодействуя с β_2 -адренорецептором, активация которого приводит к повышению внутриклеточного цАМФ, что вызывает активацию протеинкиназы, катализирующей обратимое фосфорилирование Ca^{2+} -каналов. Подчеркнем, что все указанные элементы адренореактивной системы в эритроците имеются.

Увеличение концентрации цАМФ увеличивает проницаемость мембраны для Ca^{2+} (за счет фосфорилирования определенной субъединицы Ca^{2+} -канала) [4].

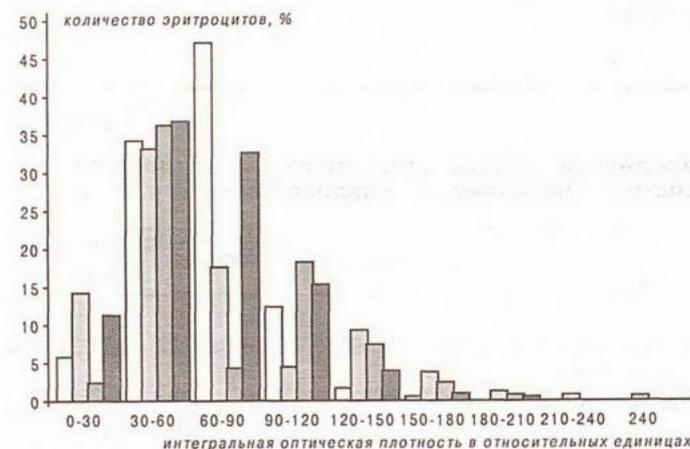


Рис.3. Распределение эритроцитов по классам в зависимости от оптической плотности под влиянием адреналина и обзидана у больных ЭндБА

1 — исходно, 2 — адреналин, 3 — обзидан, 4 — обзидан+адреналин.

Ca^{2+} вызывает диссоциацию (или распад) микрофиламентов, что приводит, по-видимому, к уменьшению визуализируемых цитоскелетных белков. Любопытно, что некоторое преобладание эффекта адреналина в группе больных ЭндБА по сравнению с группой больных ЭкзБА также может быть объяснено с позиции Ca^{2+} -влияния, учитывая, что именно при ЭндБА наблюдается наибольшее (по сравнению с ЭкзБА) снижение активности Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах [1].

Добавление β -адреноблокатора обзидана в наших исследованиях вызывает увеличение оптической плотности цитоскелета у больных ЭндБА и здоровых лиц, что в условиях блокады эффекта β -агониста (определенное количество эндогенного адреналина присутствует в пробе) и отсутствия поступления ионов Ca^{2+} в клетку может быть связано со сдвигом процесса формирования цитоскелетных белков в сторону ассоциации (сборки) актиновых микрофиламентов.

Обращает внимание, что при ЭкзБА отмечается так называемое парадоксальное влияние обзидана на содержание цитоскелетных белков, а именно — снижение. В связи с этим надо отметить, что подобная феноменология — инверсированность эффекта β -адреноблокатора на эффекторный механизм в аденилатциклазной сигнальной системе при атопии является весьма характерной. Аналогичный инверсированный эффект обзидана при атопии наблюдался ранее в исследованиях как на эритроцитарных, так и на лимфоцитарных моделях [3].

Молекулярный механизм этого феномена кроется, по всей видимости, в недавно выявленном полиморфизме генотипа β_2 -адренорецептора. Было показано, в частности, что замена остатка Asp-113 на остаток Glu в молекуле β_2 -адренорецептора, лишь незначительно меняя геометрию "кармана", где утопает лиганд, приводит к тому, что классические антагонисты β_2 -адренорецепторов, альпренолол, пропранолол, начинают активировать рецептор [12].

Нами дополнительно проанализировано распределение клеток по классам в зависимости от содержания белков цитоскелета под влиянием адреналина и обзидана (рис.1,2,3).

Из рис.1,2,3 видно, что характер сдвигов между классами клеток с различной оптической плотностью соответствует сдвигам, выявленным с помощью оценки интегральной оптической плотности. Однако, по-видимому, наблюдается определенная гетерогенность субпопуляции эритроцитов по отношению к выраженности влияния β -адренергического агониста на содержание цитоскелетных белков. Так, если у практически здоровых лиц и у больных ЭндБА такой субпопуляцией, вероятно, являются эритроциты III класса, то при ЭкзБА — IV класса.

Пока мало экспериментальных данных, чтобы обобщать эти факты с позиции полиморфизма β_2 -адренорецепторов, который наблюдается как у здоровых лиц, так и у больных ЭкзБА [12]. Однако хорошо известны данные о феномене микроцитоза (нарастание субпопуляции эритроцитов с диаметром менее 6,5 мкм), характерном для атопического состояния [3]. Это тем

более заслуживает внимания, учитывая выявленную ранее корреляцию между уровнем микроцитоза и количеством эритроцитов с малым содержанием цитоскелетных белков [6].

При анализе эффекта сочетанного применения обзидана и адреналина видно, что как у практически здоровых лиц, так и у больных ЭкзБА проявляется эффект обзидана, в то время как при ЭндБА — адреналина, что вполне объяснимо, учитывая хорошо известный перmissive эффект глюкокортикоидов, используемых у ряда больных этой группы с лечебной целью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют не только об особенностях распределения цитоскелетных белков в эритроцитах больных с различными видами БА, но и указывают на тесную связь между адренореактивной системой эритроцита и цитоскелетом.

Предстоит выяснить роль адренозависимых изменений цитоскелетных белков как одного из важнейших пострецепторных звеньев трансмембранного проведения регуляторного сигнала в патогенезе различных патофизиологических синдромов при БА, в частности, бронхоспазма, гиперсекреции, нарушений гемореологии и т.п. Подчеркнем, что в качестве адекватной модели для исследований подобного рода с успехом могут быть использованы эритроциты, оказавшиеся удобной моделью при изучении различных заболеваний полигенной природы [1,6,7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранова И.А., Орлов С.Н., Петруняк В.В. и др. АТФ-азная активность эритроцитов больных бронхиальной астмой: влияние кальцитрина // Пульмонология.— 1993.— № 1.— С.53—56.
2. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию.— М.: Изд-во МГУ, 1990.— 219 с.
3. Жихарев С.С., Минеев В.Н., Яблонская В.Н. и др. Атопическая бронхиальная астма как патология мембрано-рецепторного комплекса // Вестн. АМН СССР.— 1984.— № 2.— С.9—14.
4. Крутецкая З.И., Лонский А.В. Биофизика мембран: Учеб. пособие.— СПб.: Изд-во СПбГУ, 1994.— 288 с.
5. Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия. / Под ред. Г.Б. Федосеева.— СПб.: Нордмедиздат, 1998.— 688 с.
6. Минеев В.Н. Патогенетические и клинические аспекты нарушений мембранорецепторного комплекса эритроцитов при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1993.
7. Орлов С.Н., Баранова И.А., Покудин Н.И. и др. Транспорт одновалентных ионов и кальция в эритроцитах больных бронхиальной астмой // Вестн. АМН СССР.— 1991.— № 3.— С.43—49.
8. Перцева М.Н. Молекулярные основы развития гормонокомпетентности.— Л.: Наука, 1989.— 251 с.
9. Скопичева В.И., Скопичев В.Г., Виноградова Н.А. и др. Изменение цитоскелета клеток А-431 при действии эпидермального фактора роста // Цитология.— 1991.— Т.33, № 4.— С.60—64.
10. Федосеев Г.Б. Механизмы обструкции бронхов.— СПб.: Мед.информ., 1995.— 336 с.
11. Ченцов Ю.С., Воробьев И.А., Надежнина Е.С. Простой способ выявления центриолей и цитоскелета в клетках культуры ткани с помощью светового микроскопа // Цитология.— 1982.— Т.24., № 3.— С.243—247.
12. Strader C.D., Candelore M.R., Hill W.S. et al. A single amino acid substitution in the beta-adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists // J. Biol. Chem.— 1989.— Vol.264, № 28.— P.16470—16477.