

Скибо Юлия Валерьевна

**РЕГУЛЯЦИЯ I И II ТИПОВ ПРОГРАММИРОВАННОЙ
КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена в НИЛ биохимии нуклеиновых кислот кафедры биохимии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор **Абрамова Зинаида Ивановна**

Научный консультант: доктор медицинских наук,
профессор **Мустафин Ильшат Ганиевич**

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных основ патогенеза ФГБУ
«Казанский институт биохимии и биофизики» КазНЦ
РАН
Чернова Ольга Александровна

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
патологической физиологии ГБУ ВПО "Казанский
государственный медицинский университет"
Бойчук Сергей Васильевич

Ведущая организация: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
«Государственный научный центр Институт иммунологии» Федеральное медико-
биологическое агентство России (г. Москва).

Защита состоится «**21**» **февраля 2013 г.** в **13. 00** на заседании диссертационного
Совета Д 212.081.08. при Казанском (Приволжском) федеральном университете по
адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. 211

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени
Н.И.Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по
адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан « » января 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета Д 212.081.08.
д.б.н., профессор



З.И.Абрамова

Актуальность проблемы. Для полноценного и правильного развития и морфогенеза в многоклеточном организме существуют различные пути гибели клеток, позволяющие контролировать количество клеток и удалять инфицированные, мутированные или поврежденные клетки (Penalzoza, 2006). Апоптоз, программированная смерть клетки по типу I, является звеном многих биологических процессов у многоклеточных организмов (Green, 2009). Он связан с процессом развития и старения клеток, выполняя гомеостатическую функцию удаления поврежденных клеток (Барышников, 2002; Elmore, 2007).

В ходе исследований программы апоптоза, стало ясно, что этот путь гибели клеток не уникален. Кандидатом на роль еще одного механизма смерти стала аутофагия. Аутофагия способствует удалению цитоплазматических компонентов и активируется в ответ на изменение внешних и внутренних условий, например, истощение питательных веществ (Mehrpour, 2010). Аутофагия также может быть механизмом гибели (гибели клеток по типу II) (Pua, 2007). Тем не менее, в то время как апоптоз, безусловно, является механизмом клеточной гибели в условиях стресса, определение аутофагии как механизма самоубийства клеток в ответ на стресс по-прежнему остается весьма спорным.

Взаимодействие между аутофагией и апоптозом является установленным фактом. Аутофагия может приводить к гибели клеток двумя путями. Первый из них состоит в неограниченном «переваривании» содержимого цитоплазмы вплоть до гибели клетки, второй заключается в стимулировании апоптоза. Однако механизмы, посредством, которого происходит переключение с одного процесса на другой, не до конца ясны.

Белки теплового шока представляются новой парадигмой для скоординированного, многоступенчатого регулирования программированной клеточной гибели, позволяющие обеспечить защиту от воздействия разрушительных факторов и облегчить восстановление клеток после них (Veere, 2004). Их способность разбирать, собирать и упаковывать неправильно сложенные белки помогает избегать клетке неблагоприятных последствий от разрушительных агентов (Бобкова, 2011). Эта защитная функция белков теплового шока предполагает их способность подавлять программированную клеточную гибель, в том числе апоптоз и аутофагию.

Установлено, что в формировании аллергической реакции ведущая роль принадлежит Т-лимфоцитам (Pumputiene, 2006; Вис, 2009). Пролонгацию аллергического воспаления при бронхиальной астме связывают с усилением выживаемости Т-лимфоцитов и утратой ими способности к апоптозу (Ярилин, 1999; Бойчук, 2001; Spinozzi, 2008). Недостаточность проявления апоптоза может быть связана с тем, что происходит переключение программированной клеточной гибели с апоптоза на аутофагию.

Целью настоящей работы является характеристика механизмов устойчивости Т-лимфоцитов к программированной клеточной гибели I типа у больных atopической бронхиальной астмой с разной степенью тяжести.

В связи с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить биохимические изменения апоптоза Т-лимфоцитов в динамике у больных легкой и тяжелой формами астмы;
2. Исследовать процесс аутофагии в Т-лимфоцитах больных легкой и тяжелой формами астмы.

3. Определить влияние дексаметазона на аутофагию в Т-лимфоцитах больных легкой и тяжелой формами астмы.

4. Провести анализ содержания белков теплового шока HSP70 и HSP90 в Т-лимфоцитах *in vitro* в условиях истощения питательных веществ в зависимости от тяжести астмы.

5. Показать взаимосвязь устойчивости Т-лимфоцитов больных астмой к апоптозу в зависимости от содержания белков теплового шока HSP70 и HSP90;

6. Оценить характер изменений клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных астмой с различной чувствительностью Т-лимфоцитов к апоптозу.

Научная новизна. В работе впервые проведено исследование процесса аутофагии в Т-лимфоцитах больных атопической бронхиальной астмой в зависимости от степени тяжести заболевания. Было установлено, что в Т-лимфоцитах больных легкой формой заболевания аутофагия в условиях торможения апоптоза способствует индукции программированной клеточной гибели II типа. В Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмы установлена одновременная активация и апоптоза, и аутофагии.

Впервые получены результаты о влиянии дексаметазона, как терапевтического препарата, на процесс аутофагии в зависимости от степени тяжести заболевания. У больных с легкой формой бронхиальной астмы дексаметазон индуцирует ранние этапы апоптоза, но ингибирует аутофагию. У больных тяжелой формой заболевания дексаметазон способствует интенсивной активации аутофагии, что приводит к пролонгации функционирования Т-лимфоцитов.

Показано различное содержание белков теплового шока HSP70 и HSP90 в зависимости от степени тяжести атопической бронхиальной астмы. У больных с легкой формой заболевания установлено повышение уровня HSP90 в условиях *in vitro*. В группе больных с тяжелой формой астмы установлено наличие как HSP70, так и HSP90, внутриклеточное содержание которых снижалось в процессе культивирования Т-лимфоцитов в связи с их выходом во внеклеточное пространство. Секрета HSP70 и HSP90 в межклеточную среду коррелирует с активацией апоптоза и аутофагии.

Научно-практическая значимость. Полученные результаты, свидетельствующие об активации аутофагии в Т-лимфоцитах больных атопической бронхиальной астмой, расширяют существующие представления о роли программированной клеточной гибели в функционировании иммунной системы. В частности, установлено, что аутофагия способствует длительному функционированию Т-лимфоцитов при тяжелой форме астмы, что приводит к персистенции заболевания. При легкой форме заболевания устойчивость Т-лимфоцитов к апоптозу (ПКГ I типа) компенсируется индукцией ПКГ II типа (т.е. гибелью клеток по типу аутофагии). Различные проявления аутофагии в Т-лимфоцитах в зависимости от тяжести бронхиальной астмы могут быть использованы для поиска новых терапевтических мишеней в лечении астмы.

Особый интерес для практического применения имеют полученные в работе данные о роли белков теплового шока HSP70 и HSP90 и их взаимосвязь с апоптозом и аутофагией, что может послужить основанием для их использования в коррекции программированной клеточной гибели. Применение терапевтических веществ, в том числе дексаметазона, снижающих накопление белка Hsp90 внутри клеток, может

способствовать повышению апоптотического процесса в Т-лимфоцитах у больных легкой и тяжелой формами АБА.

Установленная в работе активация аутофагии в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой под влиянием дексаметазона расширяет спектр действия данного глюкокортикостероида и имеющиеся в настоящее время данные о его влиянии на иммунную систему и воспаление.

Положения, выносимые на защиту:

1. Устойчивость Т-лимфоцитов периферической крови больных легкой и тяжелой формами астмы к I типу программированной клеточной гибели (апоптозу) сопровождается активацией аутофагии.
2. Снижение апоптотической активности и активация аутофагии в Т-лимфоцитах больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы сопровождаются накоплением внутриклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90.
3. Дексаметазон является одним из экзогенных факторов, оказывающих стимулирующее влияние на аутофагию в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой бронхиальной астмой.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на II Международном молодежном медицинском конгрессе “Санкт-Петербургские научные чтения” (г. Санкт-Петербург, 2007); на II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (г.Казань, 2008); на IV международном съезде биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 2008); на XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (г. Москва, 2009); на X Международном конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (Казань, 2009); на II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия-2009» (г. Пермь, 2009); на XIII Всероссийском форуме с международным участием им. академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 2009 г.; на XIII Европейском симпозиуме студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-2009» (г. Казань, 2009); на I Всероссийской интернет-конференции «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (г. Казань, 2010); на 4 Международной конференции для молодых ученых “Molecular biology: advances and perspectives” (Kyiv, 2011); на IV Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (г. Казань, 2012); на 7 Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г.Челябинске», 2012 г; на Международном форуме, посвященный тяжелой форме астмы ISAF-2012 (Gothenburg, Sweden); на III Международной научной онлайн-конференции "Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий" (г. Казань, 2012).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 27 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 174 машинописных страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов), выводов и списка литературы (319 источников, из них 42 отечественных и 277 зарубежных). Диссертация содержит 3 таблицы и 46 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом изучения послужили Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и больных атопической бронхиальной астмой с легкой и тяжелой формами заболевания. Диагноз и степень тяжести атопической бронхиальной астмы верифицировали согласно критериям «Глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения астмы» (GINA, 2008).

Выделение субпопуляции Т-лимфоцитов. Лейкоцитарную фракцию выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколл ($\rho = 1,077$). Для получения чистой популяции Т-лимфоцитов использовали метод иммуномагнитной сепарации с использованием антител к поверхностному рецептору Т-лимфоцитов - CD3 (Dynabeads Untouched Human T cells, Dynal, Invitrogen).

Культивирование Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты инкубировали в CO₂-инкубаторе (с 5 %-ным CO₂) в питательной среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%), пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл/5000 мкг/мл) и L-глутамин (1%) в расчете 2×10^6 кл./мл. В качестве индуктора апоптоза использовали дексаметазон (10^{-2} М) (конечная концентрация 10^{-4} М).

Оценка апоптоза Т-лимфоцитов. Оценку апоптоза Т-лимфоцитов проводили на 3 и 6 сутки культивирования с использованием нескольких методов, включающие:

- выявление экспрессии фосфатидилсерина на поверхности Т-лимфоцитов флуоресцентной меткой мероцианином 540 (MC540) по следующему протоколу. Раствор MC540 (концентрация 1 мг/мл) в объёме 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^6 кл./мл. Клеточную суспензию перемешивали и инкубировали в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Регистрацию результатов осуществляли на втором детекторе FL2 цитометра. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток.

- выявление фрагментации ДНК в Т-лимфоцитах с применением набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen). Для выявления фрагментации ДНК в Т-лимфоцитах клетки отмывали дважды холодным ФСБ, после чего ресуспендировали в 1X Аннексин V связывающем буфере в концентрации 1×10^6 клеток / мл. К суспензии клеток добавляли 5 мкл аннексина V и 5 мкл пропилий йодида (PI). Клеточную суспензию инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли 400 мкл 1X Аннексин V связывающего буфера. Образцы анализировали на первом FL1 и третьем FL3 детекторах цитометра в течение 1 часа с применением программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson). На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток.

Регистрацию результатов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCalibur (“Becton Dickinson”).

Ультроструктурная характеристика Т-лимфоцитов. Клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин 2000 rpm при +18°C (Eppendorf, 5810R), супернатант удаляли, а полученный осадок из Т-лимфоцитов фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида (1 - 2 ч) и в 1 %-ном растворе OsO₄ (2 ч). Далее образцы дегидратировали в этаноле восходящей концентрации (30⁰, 40⁰, 50⁰, 60⁰, 70⁰, 96⁰), ацетоне и окиси пропилену. Материал заливали эпоксидной смолой Эпон – 812. Полимеризовали образцы в течение трёх суток в термостате при температуре 37, 45 и 60°C.

Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме "Ultratom III" (ЛКБ, Швеция). Срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривались на электронном микроскопе Hitachi -125 (Япония).

Оценка аутофагии в Т-лимфоцитах. Визуализацию аутофагосом проводили после 3 дней культивирования с применением первичных моноклональных антител (LC3B rabbit monoclonal antibody, Invitrogen) и вторичных меченых FITC антител (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen) на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioScope A1 (оснащенный видеокамерой AxioCam MRc5). После окончания культивирования клетки отмывали ФСБ, добавляли 3,7% формальдегид, приготовленный на ФСБ, и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Фиксатор удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 2000 rpm при +18°C (Eppendorf, 5815R). Затем клетки промывали три раза ФСБ. После отмывки от фиксатора к клеткам добавляли 0,2% Triton X-100, приготовленный на ФСБ, и инкубировали их в течение 15 минут при комнатной температуре. Пермебилизирующий буфер удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 2000 rpm при +18°C (Eppendorf, 5815R). Добавляли рабочий раствор первичных антител к клеткам и инкубировали их в течение 1 часа при комнатной температуре. По окончании инкубации удаляли раствор первичных антител центрифугированием в течение 10 мин при 2000 rpm при +18°C (Eppendorf, 5815R) и промывали клетки три раза ФСБ. Затем инкубировали клетки со вторичными антителами в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Клетки промывали ФСБ, заключали под покровное стекло и визуализировали аутофагосомы под флуоресцентным микроскопом.

Электрофоретическое разделение клеточных белков и вестерн-блотт анализ. Для разделения клеточных белков использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия (Laemmli, 1970). Гели, содержащие 4% и 8% акриламид (концентрирующий и разделяющий гели, соответственно), готовили с использованием 30% акриламида и 0,7% раствора метиленбисакриламида. Для полимеризации гелей использовали TEMED и персульфат аммония. Электрофорез проводили в вертикальном направлении при силе тока 30мА/гель в электродном буфере.

По окончании электрофореза инкубировали гель, нитроцеллюлозную мембрану, фильтровальную бумагу и спонжи в холодном Трансфер буфере в течение 15 мин. Затем собирали сэнович, заполняли систему для переноса тем же буфером. Запускали блоттинг с постоянным током 350 мА в течение 1,30 ч для 2 гелей или 45 мин для 1 геля. После переноса белков, мембрану промывали в ФСБТ буфере и помещали в блокирующий буфер. Инкубация 1 час при комнатной температуре. Затем мембрану промывали ФСБТ буфером, добавляли первичные антитела (против HSP70, HSP90, LC3B и α -тубулина) и инкубировали в течение ночи при +4°C. Спустя 12 часов мембрану промывали в ФСБТ и добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Инкубировали 1 час при комнатной температуре. Далее мембрану промывали ФСБТ буфером, инкубировали в течение 1 мин с люминолом на основе хемилюминисцентного субстрата (ECL) и детектировали хемилюминисценцию целевых белков с помощью хемидокументирующей системы ChemiDoc™ XRS+.

Оценка содержания внеклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90. После культивирования Т-лимфоцитов проводилось осаждение всех белков питательной среды, в которой находились Т-клетки в процессе роста, сульфатом аммония. Затем

проводили диализ против фосфатно-солевого буфера (рН 7,4). Для разделения внеклеточных белков использовали метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970). Содержание белков HSP70 и HSP90 оценивали методом иммуноблоттинга.

Фенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии. Популяции лимфоцитов были проанализированы на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с применением программных обеспечений CellQuest и MultiSet (Becton Dickinson). Для исследований брали по 50 мкл цельной крови с антикоагулянтом. Окрашивание клеток проводили с использованием комбинаций двух-, четырехцветных моноклональных антител поставляемых в наборе MultiTEST ИМК (Becton Dickinson): CD3+; CD8+; CD45+; CD4+ и CD3+; CD16 +; CD56+; CD45+; CD19+ в течение 15 минут в темноте в соответствии с протоколом.

Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке. Содержание иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG в сыворотке крови оценивали методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini (Mancini G., 1965 г.), IgE — иммуноферментным методом (ЗАО «ДИАплюс», Москва) согласно инструкции производителя.

Выделение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Выделение гигантских, крупных, средних и мелких ЦИК проводили осаждением 125 мкл сыворотки крови, разбавленной в 0,2 М боратном буфере, рН 8,6-соответственно 3, 3.5, 4 и 7% ПЭГ (6 кДа) в конечном объеме инкубационной смеси. После инкубации при 4°С в течение 18-20 часов смесь центрифугировали в течение 10 минут при 3000 rpm (Eppendorf, 5415R). Полученные осадки содержали разные по размеру фракции ЦИК, условно названные гигантскими (3%), крупными (3.5%) и средними (4%). К надосадочному раствору 3.5% ПЭГ добавляли 22% раствор ПЭГ в том же буфере до конечной концентрации 7%, инкубировали при 4°С в течение 18-20 часов и осадок, содержащий мелкие ЦИК, отделяли центрифугированием. Для оценки количественного содержания ЦИК в сыворотке крови полученные осадки суспендировали в 0,1 М NaOH и измеряли плотность оптического поглощения в УФ-области спектра при 280 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием структурных характеристик (медианы, перцентиля), а для оценки различий между отдельными выборками применяли непараметрические критерии Крускала-Уоллиса (для общей характеристик выборки) и Т-критерия Манна – Уитни (для парных сравнений различных выборок) (Акберова, 2004). Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена-г_s. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение морфологии Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных atopической бронхиальной астмой

Методами трансмиссионной электронной (ТЭМ) и атомно-силовой микроскопий (АСМ) были получены микрофотографии Т-лимфоцитов в различных группах.

На полученных микрофотографиях Т-лимфоцитов здоровых доноров клетки имеют правильную округлую форму (рис. 1). Клеточная мембрана ровная, без инвагинаций. Ядро, как правило, расположено центрально и занимает большую часть клетки:

локализация хроматина периферическая, кариоплазма электронно-светлая. Все мембранные структуры целостны и хорошо прорисованы - митохондрии правильной формы с хорошо дифференцированными кристами. Чаще всего, скопления митохондрий наблюдаются медиально, недалеко от ядра. В цитоплазме различимы рибосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Наличие микроворсинок на поверхности плазматической мембраны свидетельствует об их функционально активном состоянии. Результаты ТЭМ подтвердились данными АСМ (рис. 1,б).

Среди структурно-функциональных систем клетки важную роль играет плазматическая мембрана, обеспечивающая барьер клетки, ионный транспорт, внутриклеточную передачу информации и т.д. Важнейшими компонентами плазматической мембраны являются белки. Они определяют морфологические и механические свойства клетки, нарушение которых может приводить к изменению ее жизнедеятельности или даже гибели.

Атомно-силовая микроскопия позволяет получать информацию о поверхности клеток. Мы установили, что на плазматической мембране Т-лимфоцитов четко выявляются глобулы, предположительно, являющиеся частью мембранных интегральных и полуинтегральных белков, а также фрагментов гликокаликса (рис. 1, в). Размер глобул составляет $50 \pm 7,5$ нм, $p < 0,05$. Плазматическая мембрана контрольных лимфоцитов отличается диффузионным, упорядоченным рельефом.

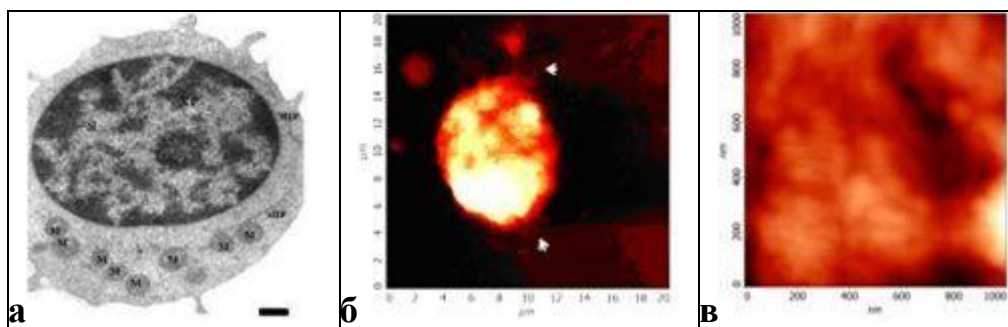


Рис. 1. Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. (а) Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью электронной микроскопии. Шкала - 500 нм, увеличение 12000 раз; (б) Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью атомно-силовой микроскопии; в) Изображение поверхности Т-лимфоцита здорового донора. Я – ядро, ХР – хроматин, М – митохондрия, АГ – Аппарат Гольджи, ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Стрелками показаны микроворсинки и псевдоподии.

Большая часть Т-лимфоцитов легкой формой астмы обладает характерными морфологическими признаками Т-клеток, однако часть лимфоцитов имеет незначительные морфологические отличия по сравнению с контрольной группой (рис. 2, а). Для всех Т-лимфоцитов данной группы характерно наличие правильной овальной формы. Однако плазматическая мембрана, в отличие от контрольной группы, образует инвагинации. Ядра лимфоцитов, как и сами клетки, имеют овальную форму, ярко выраженный лопастной вид. Хроматин ядра – конденсированный и расположен по его периферии. В цитоплазме различимы клеточные компоненты.

На АСМ-изображениях Т-лимфоциты данной группы больных, также как и на ТЭМ-микроснимках, имеют правильную округлую форму с достаточно крупным ядром, которое занимает почти весь объем клетки (рис. 2, б). Ядро имеет овальную форму и расположено эксцентрично. В сравнении с лимфоцитами контрольной группы, у Т-клеток

больных легкой формой астмы отсутствуют клеточные микроворсинки, но сама клеточная мембрана формирует различные инвагинации. На поверхности плазматической мембраны глобулярная структура выявляется более отчетливо, чем в контрольной группе. Количество глобул увеличивается, но размер их уменьшается ($20,5 \pm 5,5$ нм; $p < 0,05$) (рис. 2, в).

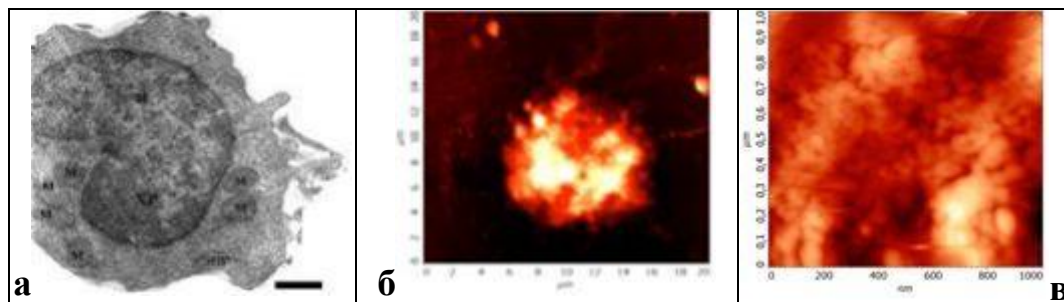


Рис. 2. Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови больных легкой формой атопической бронхиальной астмой. а) Микрофотография типичного Т-лимфоцита больного легкой формой АБА, полученная с помощью электронной микроскопии. Шкала – 1 мкм, увеличение 12000 раз; б) Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью атомно-силовой микроскопии; в) Изображение поверхности Т-лимфоцита больного легкой формой астмы. Я – ядро, ХР – хроматин, М – митохондрия.

Мы можем предположить, что подобная структура связана с появлением различных белков на поверхности клеток, например, маркеров активации CD4+ лимфоцитов или белков-адгезии (L-селектинов), экспрессия которых увеличивается при бронхиальной астме (Simon, 2010).

В группе больных тяжелой формой астмы наряду с нормальными клетками, встречаются Т-лимфоциты с морфологическими изменениями (рис. 3, а). Обнаруживаются глубокие инвагинации ядерных мембран, изменения цитолеммы и поверхностных структур клетки, отсутствие микроворсинок и десмосом. Клеточная поверхность формирует многочисленные выросты, выявляются блеббинги. Отмечено наличие везикул с электронно-светлым содержимым, мультиламеллярных телец, а также аутофагосом с содержимым средней электронной плотности. Целостность мембран Т-лимфоцитов не нарушена.

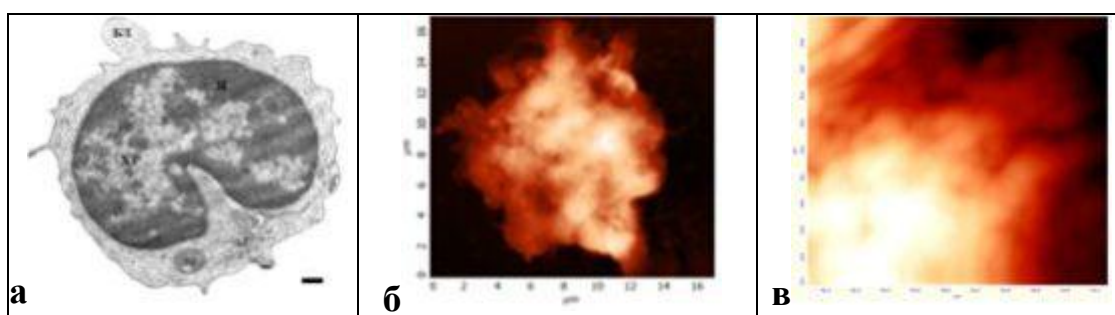


Рис. 3. Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови больных тяжелой формой атопической бронхиальной астмой. а) Микрофотография типичного Т-лимфоцита больного тяжелой формой астмы, полученная с помощью электронной микроскопии. Шкала – 500 нм, увеличение 12000 раз; б) Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью атомно-силовой микроскопии; в) Изображение поверхности Т-лимфоцита больного тяжелой формой астмы. Я – ядро, ХР – хроматин, М – митохондрия, АГ – Аппарат Гольджи, АФ – аутофагосома, БЛ - блеббинг.

АСМ-исследование Т-лимфоцитов больных тяжелой формой астмы показало, что эта группа характеризуется наличием как нормальных клеток с типичной сферической

формой, так и с выраженными морфологическими изменениями (рис. 3, б). Клеточная мембрана образует многочисленные глубокие инвагинации, микроворсинки и псевдоподии отсутствуют. Ядро также формирует инвагинации.

Сканирование поверхности Т-лимфоцитов больных тяжелой формой астмы показало, что, также как и в группе с легкой формой, имеется большое количество глобулярных структур, но они большего размера ($47,1 \pm 11,3$ нм; $p < 0,05$). В то время как у измененных клеток глобулы становятся трудноразличимыми, диффузионными, а их количество уменьшается (рис. 3, в).

Топографические и наноструктурные изменения Т-лимфоцитов в группе с тяжелой формой астмы могут быть связаны с перестройкой цитоскелета и / или более массовой активацией Т-клеток, чем у больных с легкой формой заболевания.

Для взаимодействия клеточных и гуморальных компонентов между собой необходимо участие молекул адгезии. При воспалении происходит повышенная экспрессия молекул адгезии в очаге воспаления, что приводит к аккумуляции и задержке лимфоцитов в бронхах.

С помощью метода атомно-силовой микроскопии была определена сила адгезии на поверхности Т-лимфоцитов у больных с разной степенью тяжести астмы. Считая линейной зависимость силы от смещения кантилевера относительно поверхности клетки, сила адгезии F (измеряемая в наноньютонах, нН) определяется согласно закону Гука:

$$F = k * dH$$

dH - величина изгиба кантилевера,
 k - силовая постоянная кантилевера.

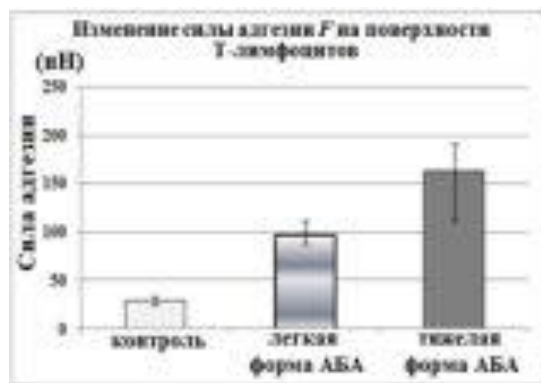


Рис. 4. Изменение силы адгезии на поверхности Т-лимфоцитов в зависимости от степени тяжести бронхиальной астмы.

При исследовании Т-лимфоцитов в различных группах нами были получены значения силы адгезии на поверхности Т-клеток и выявлена прямая корреляционная зависимость между значением силы адгезии F и степенью тяжести заболевания (рис. 4). Было установлено, что с увеличением тяжести астмы происходит увеличение силы адгезии на поверхности Т-лимфоцитов. Таким образом, можно предположить, что повышенная аккумуляция Т-лимфоцитов на стенках бронхов может быть обусловлена молекулами адгезии и межмолекулярным взаимодействием и, как показано в проведенном эксперименте. Полученные результаты исследований могут быть полезны для дальнейшего понимания взаимосвязи между топографией клеток (механическими свойствами плазматической мембраны) и функцией Т-лимфоцитов в иммунном ответе.

С целью выяснения характера нарушений программированной гибели Т-лимфоцитов при бронхиальной астме и влияния на данный процесс синтетического глюкокортикоида - дексаметазона – на следующем этапе работы было проведено исследование выраженности спонтанного и индуцированного апоптоза в Т-лимфоцитах пациентов после 3 и 6 дней культивирования *in vitro*.

Оценка апоптоза Т-лимфоцитов периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой

Для изучения биохимических параметров апоптоза, инициация которого происходит в процессе длительного культивирования клеток, было необходимо оценить, во-первых, динамику роста Т-лимфоцитов на 3 и 6 сутки культивирования. И, во-вторых, исследовать влияние дексаметазона (индуктора апоптоза) на рост клеток в культуре.

Сравнительный анализ показал, что в группе с легкой формой астмы динамика роста Т-лимфоцитов в целом совпадает с группой контроля (рис. 5). Однако мы установили, что, несмотря на добавление в питательную среду дексаметазона, клетки больных легкой формой астмы проявляли устойчивость к апоптозу, что выражалось в незначительном снижении количества Т-лимфоцитов под влиянием глюкокортикоида на 3 сутки культивирования (рис. 5, а). На 6 сутки культивирования содержание Т-клеток в группе с легкой формой астмы было достоверно выше по сравнению с группой контроля. Падение содержания Т-лимфоцитов на 6 сутки культивирования связано со снижением содержания питательных веществ в среде, вследствие чего в клетках происходит активация программы гибели (рис. 5, б). Таким образом, изменение содержания Т-лимфоцитов в группе с легкой формой заболевания относительно контрольной группы на 6 сутки культивирования может быть связано с подавлением апоптоза, что согласуется с литературными данными (Бойчук, 2001; Spinozzi, 2008). Однако установленные изменения могут быть проявлением активации другого физиологического процесса – аутофагии, которая способствует выживанию клеток в условиях снижения питательных веществ.

Изменение динамики пролиферативной активности было также выявлено в группе с тяжелой формой астмы (рис. 5). В отличие от здоровых доноров и больных легкой формой астмы, у больных с тяжелой формой содержание Т-лимфоцитов относительно 0 суток практически не менялось как на 3, так и на 6 сутки культивирования (рис. 5, а, б). Незначительное повышение количества Т-клеток к 3 суткам говорит о снижении пролиферативной активности клеток. А слабое падение содержания Т-лимфоцитов на 6 сутки, так же как и в группе с легкой формой заболевания, может быть связано с устойчивостью клеток к апоптозу, либо с активацией аутофагии.

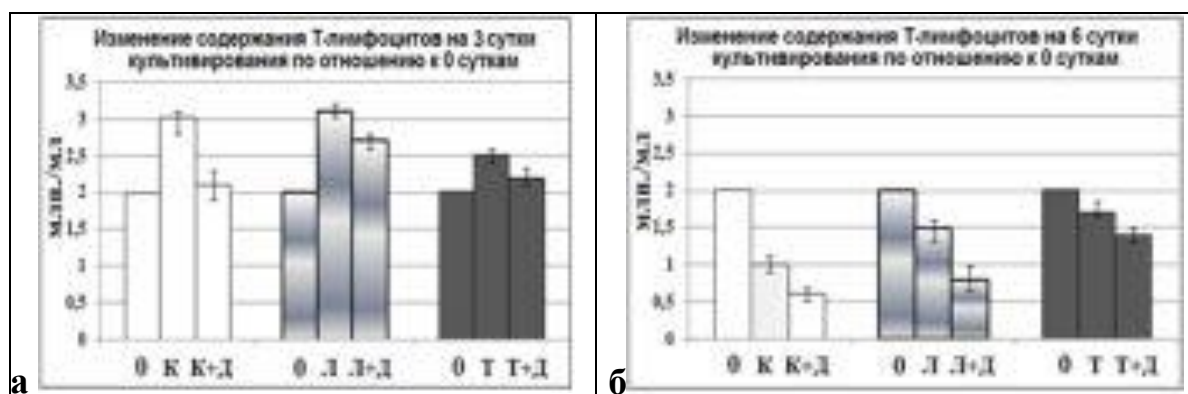


Рис. 5. Изменение содержания Т-лимфоцитов в группах контроля (К) и больных бронхиальной астмой с легкой (Л) и тяжелой (Т) формами астмы в присутствии и отсутствии в питательной среде дексаметазона (Д) (10^{-4} М) на 3 (а) и 6 сутки (б) культивирования.

Изменение динамики пролиферативной активности в зависимости от тяжести заболевания может быть обусловлено активацией апоптотического процесса. Спонтанную

инициацию апоптоза можно наблюдать уже в первые дни культивирования, однако, она не значительна. Поэтому мы провели исследование биохимических параметров апоптоза Т-лимфоцитов до их культивирования (рис. 6). Результаты показали, что содержание апоптотических клеток во всех исследуемых группах не превышает 2% от общего количества лимфоцитов.

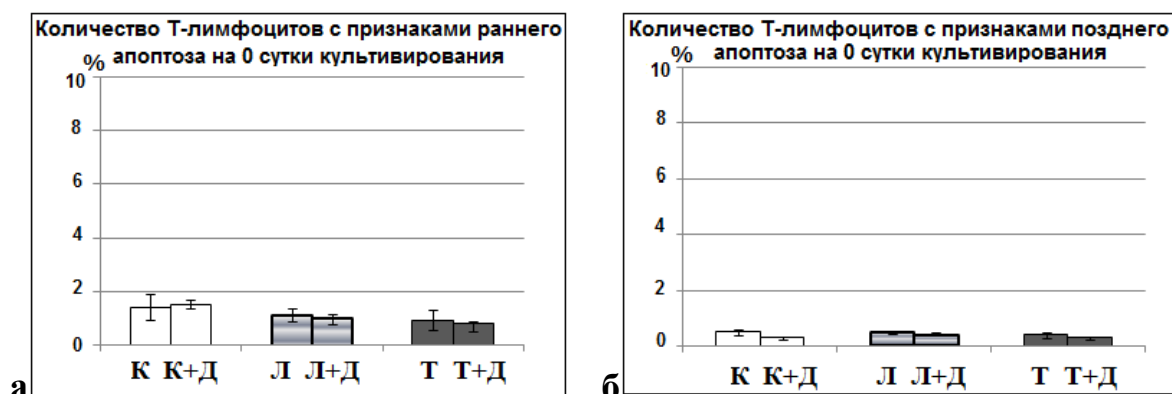


Рис. 6. Содержание Т-лимфоцитов с ранними (а) и поздними (б) признаками апоптоза в группах больных легкой (Л) и тяжелой (Т) формами атопической бронхиальной астмы, а также в группе контроля (К) до культивирования в присутствии и отсутствии дексаметазона (Д) (10^{-4} М).

Длительное культивирование лимфоцитов в питательной среде сопровождается истощением ростовых факторов, вследствие чего запускается апоптоз. Исследование основных биохимических параметров апоптоза (экспрессия фосфатидилсерина на плазматической мембране и фрагментация ДНК) проводилось на 3 и 6 сутки культивирования.

Оценка экспрессии фосфатидилсерина (ФС) на поверхности клеток на 3 сутки культивирования показала, что содержание Т-лимфоцитов с ранними признаками апоптоза достоверно ниже ($p < 0,05$) у больных астмой (рис. 7, а). Инкубация с дексаметазоном индуцировала транслокацию фосфатидилсерина с внутренней стороны плазматической мембраны на внешнюю, инициируя, таким образом, ранние этапы апоптотического процесса, однако динамика существенно различалась между лимфоцитами различных групп (рис. 7, а). Наиболее высокое содержание апоптотических клеток отмечено в группе контроля. Индуцирующее влияние дексаметазона на апоптоз также отмечено в группе с легкой формой астмы. В группе с тяжелой формой под влиянием дексаметазона содержание клеток с ранними признаками апоптоза оказалось наименьшим.

Продолжение культивирования Т-лимфоцитов в питательной среде в течение 6 суток показало относительную резистентность к развитию апоптоза в группах с легкой и тяжелой формой заболевания, в то время как в контрольной группе отмечено достоверное повышение содержания апоптотических клеток (рис. 7, б). Культивирование клеток с дексаметазоном привело к увеличению содержания апоптотических клеток во всех исследуемых группах (рис. 7, б).

Содержание Т-лимфоцитов, находящихся на поздней стадии апоптоза, после 3 суток культивирования было не значительным во всех исследуемых группах (рис. 8, а). Добавление дексаметазона стимулировало апоптоз в Т-лимфоцитах, за исключением группы больных тяжелой формой астмы, в которой клетки проявляли слабую чувствительность к индуцированному апоптозу.

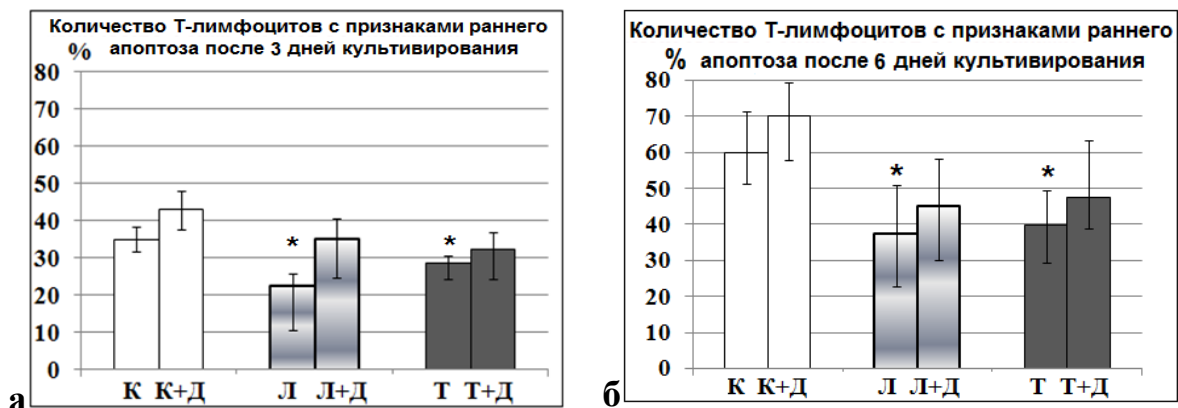


Рис. 7. Изменение содержания Т-лимфоцитов с ранними признаками апоптоза в группах больных легкой (Л) и тяжелой (Т) формами atopической бронхиальной астмой, а также в группе контроля (К) в процессе культивирования в присутствии и отсутствии в питательной среде дексаметазона (Д) (10^{-4} М). а) Содержание Т-лимфоцитов после 3 дней культивирования; б) Содержание Т-лимфоцитов после 6 дней культивирования.

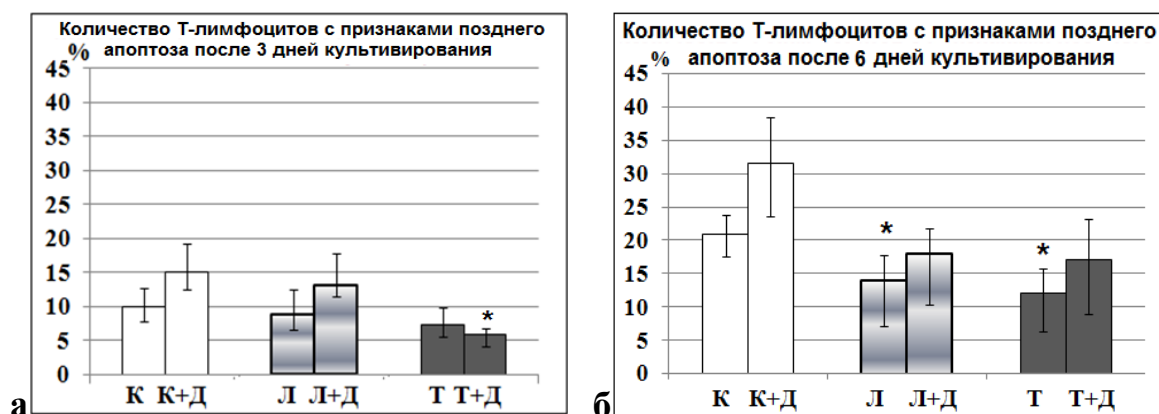


Рис. 8. Изменение содержания Т-лимфоцитов с поздними признаками апоптоза в группах больных легкой (Л) и тяжелой (Т) формами atopической бронхиальной астмой, а также в группе контроля (К) в процессе культивирования в присутствии и отсутствии в питательной среде дексаметазона (Д) (10^{-4} М). а) Содержание апоптотических Т-лимфоцитов после 3 дней культивирования; б) Содержание апоптотических Т-лимфоцитов после 6 дней культивирования.

На 6 сутки культивирования установлено повышение содержания клеток с поздними признаками апоптоза в контрольной группе (рис. 8, б). В группах с легкой и тяжелой формами астмы содержание апоптотических клеток оказалось достоверно ниже ($p < 0,05$). Культивирование Т-лимфоцитов больных астмой с дексаметазоном в течение 6 суток оказало слабую стимуляцию апоптоза (рис. 8, б).

Поскольку были получены противоречивые данные относительно динамики пролиферативной активности Т-лимфоцитов и установлено угнетение апоптотического процесса у больных АБА, на следующем этапе работы мы провели изучение другого типа ПКГ – аутофагии.

Оценка аутофагии в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой.

Мы провели морфологический анализ микрофотографий Т-лимфоцитов всех исследуемых групп (полученных с помощью метода электронной микроскопии) на 3 сутки культивирования. Поскольку в настоящее время отсутствует информация о влиянии дексаметазона на процесс аутофагии, мы исследовали его влияние на процесс аутофагии.

В результате экспериментальных работ мы установили, что большая часть Т-лимфоцитов здоровых доноров обладает морфологией, соответствующей апоптотическим изменениям на ранней стадии процесса, однако аутофагосомы не были выявлены (рис. 9, а). Культивирование с дексаметазоном привело к стимуляции поздних этапов апоптоза, что согласовывалось с результатами цитометрии (рис. 9, б). Активация аутофагии (наличие аутофагосом в клетках) под влиянием дексаметазона не была установлена.

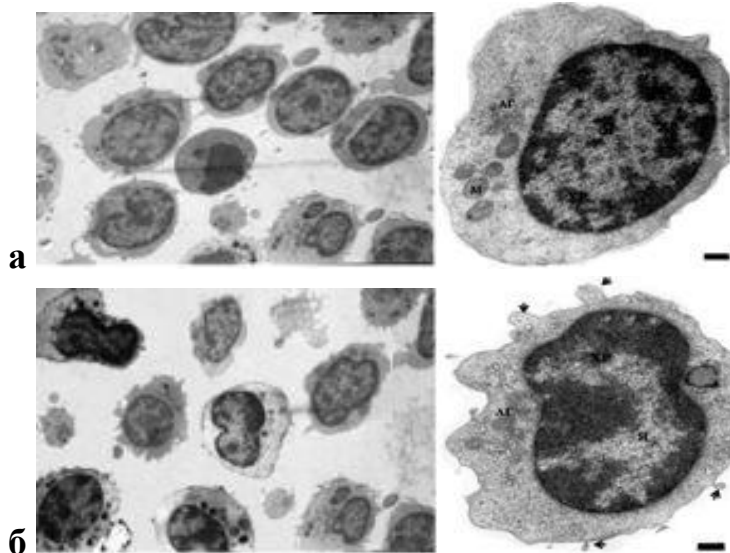


Рис. 9. Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови здорового донора после 3 дней культивирования.

а) Культивирование без дексаметазона;

б) Культивирование с дексаметазоном (10^{-4} М).

Шкала – 500 нм, увеличение $\times 12000$.

Я – ядро, ХР – хроматин, М – митохондрия, АГ – аппарат Гольджи, Л – лизосома. Стрелками показаны блеббинги.

Анализ микрофотографий Т-лимфоцитов больных легкой формой АБА показал, что большая часть клеток сохраняет типичную морфологию пролиферирующих клеток (рис. 10, а). Но при этом обнаружены крупные аутофагосомы, внутри которых достаточно хорошо детерминированы различные клеточные компоненты (рис. 10, а, б). Инициация аутофагии в клетках вызвана истощением питательных веществ в среде в процессе культивирования. Можно предположить, что в отличие от контрольной группы, где стресс индуцирует апоптоз, в группе с легкой формой астмы Т-лимфоциты продолжают функционировать, получая необходимые соединения за счет «переваривания» собственных компонентов.

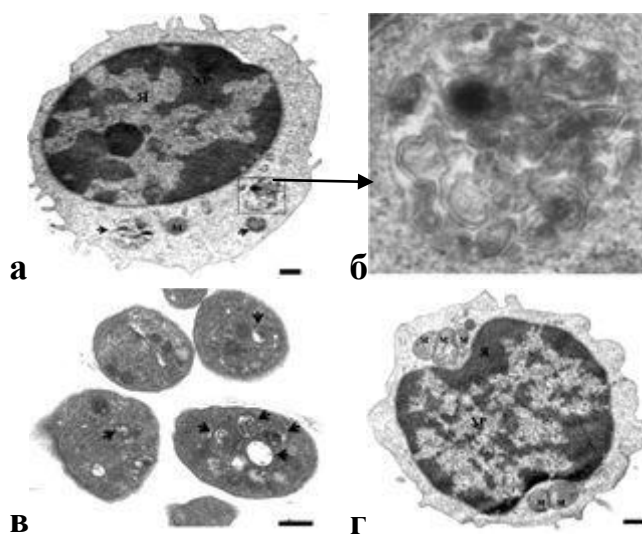


Рис. 10. Микрофотографии Т-лимфоцитов больных легкой формой астмы после 3 дней культивирования. Культивирование без дексаметазона (а). Аутофагосома с различными клеточными компонентами внутри (б), увеличение $\times 72000$; Фрагменты Т-лимфоцитов, образовавшиеся путем запуска ПКГ по типу II (в). Культивирование с дексаметазоном (10^{-4} М) (г).

а, г – шкала 500 нм, увеличение $\times 12000$.

в – шкала 1 мкм, увеличение $\times 12000$.

Я – ядро, ХР – хроматин, М – митохондрия. Стрелками показаны аутофагосомы

Помимо лимфоцитов с вышеописанными морфологическими изменениями были обнаружены фрагменты погибших клеток, в которых большая часть содержимого представлена аутофагосомами (рис. 10, в). Это может свидетельствовать о том, что гибель

клеток была опосредована запуском ПКГ по типу II или аутофагической гибели, а не апоптотической. Таким образом, в условиях снижения апоптотической активности в Т-клетках больных легкой формой астмы инициируется программа аутофагии, способствующая гибели клеток и поддержанию клеточного гомеостаза в целом.

Культивирование Т-лимфоцитов больных легкой формой заболевания с дексаметазоном сказывалось на стимулировании ранних этапов апоптоза и ингибировании аутофагии (рис. 10, г).

У больных тяжелой формой астмы наряду с характерными признаками ранних и поздних этапов апоптоза было отмечено повышенное содержание вакуолей и аутофагосом (рис. 11, а, б). То есть в Т-клетках возникает парадоксальная ситуация: с одной стороны инициируется программа гибели клетки - апоптоза, с другой стороны происходит активация аутофагии, способствующая выживанию Т-лимфоцитов. Вероятно, в данном случае аутофагия является необходимым стимулом апоптоза. Культивирование клеток данной группы больных с дексаметазоном способствовало интенсивной активации аутофагии: отмечено значительное увеличение количества и размера аутофагосом в клетках (рис. 11, в, г). При этом апоптотические проявления оказываются незначительными.

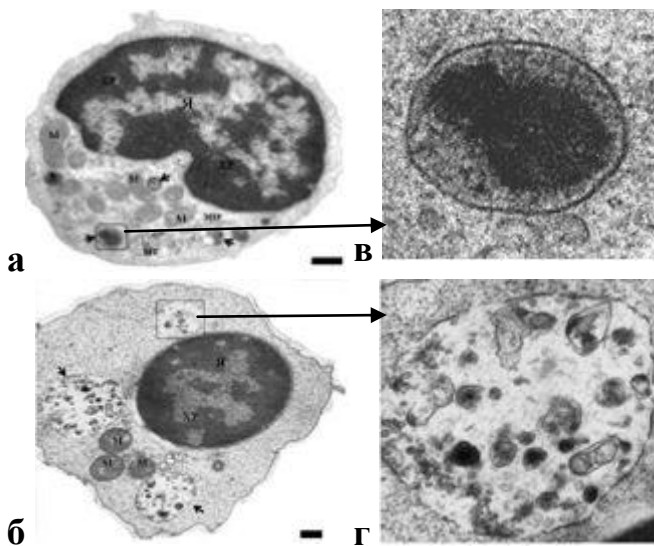


Рис. 11. Микрофотографии Т-лимфоцитов больных тяжелой формой астмой после 3 дней культивирования. Культивирование без дексаметазона (а); Культивирование с дексаметазоном (10^{-4} М) (в).

а, в - шкала – 500 нм, увеличение x12000.

(в, г) Аутофагосомы, сформированные вокруг клеточного материала. Увеличение x 72000.

Я – ядро, ХР – хроматин, М– митохондрия, Л – лизосома, МТ – мультивезикулярное тело, ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Стрелками показаны аутофагосомы

Оценка аутофагии в Т-лимфоцитах по уровню экспрессии LC3 белка

В результате проведенных исследований мы установили, что в Т-лимфоцитах здоровых доноров экспрессия LC3В белка отсутствует (рис. 12, а). У больных как с легкой (рис. 12, б), так и с тяжелой формой АБА (рис. 12, в), выявлено наличие аутофагосом в Т-клетках, однако их количество и интенсивность экспрессии белка выше в группе больных с тяжелой формой астмой.

Аналогичные результаты были получены и на проточном цитофлуориметре, с помощью которого возможно количественно оценить интенсивность флуоресценции (рис. 13, а). Статистический анализ показал, что экспрессия LC3В белка достоверно выше ($p < 0,05$) в группе с тяжелой формой астмы (рис. 13, б).

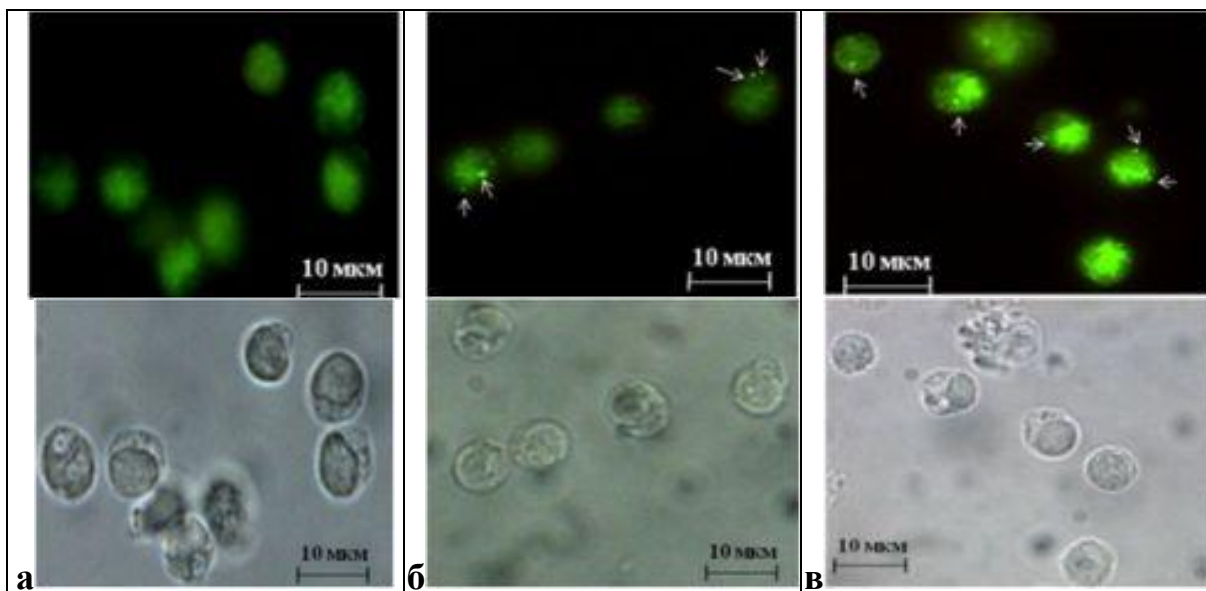


Рис. 12. Микрофотографии Т-лимфоцитов здорового донора и больных легкой и тяжелой формами бронхиальной астмы после 3 дней культивирования. (а) Установлено отсутствие экспрессии LC3B белка в Т-лимфоцитах здорового донора; (б) Экспрессия LC3B белка на аутофагосомах в Т-лимфоцитах больных легкой формой астмы; (в) Экспрессия LC3B белка на аутофагосомах в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой АБА. Увеличение микрофотографий $\times 100$. Стрелками показаны аутофагосомы, экспрессирующие LC3B белок.

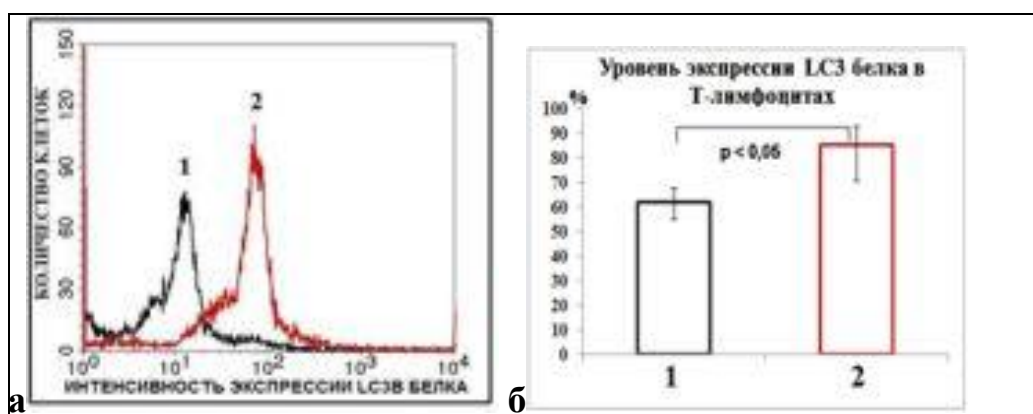


Рис. 13. Количественная оценка и интенсивность экспрессии LC3B белка в Т-лимфоцитах больных легкой (1) и тяжелой (2) формами астмы. Клетки окрашены антителами к LC3B белку, конъюгированные с FITC. В каждом образце было собрано и проанализировано 10000 событий.

Для переваривания клеточных компонентов, подлежащих удалению, необходимо слияние аутофагосом с лизосомами, содержащие гидролазы, в результате чего образуются аутофаголизосомы (Meirouir, 2010). Поэтому количество аутофагосом в клетках должно коррелировать с количеством лизосом.

В результате проведенных исследований мы установили наличие лизосом в Т-клетках больных как легкой, так и тяжелой формами астмы (рис. 14, б, в). Их количество и интенсивность экспрессии была выше в группе больных с тяжелой формой АБА (рис. 14, в).

LC3 белок (микротубулин-связанный белок легкой цепи 3) присутствует в цитозоле большинства типов клеток и существует в трех изоформах (А, В и С). При запуске аутофагии под воздействием цистеиновой протеазы Atg4 он протеолитически разрушается, образуя LC3-I форму (Kabeya, 2000). Отщепленный LC3-I белок затем активируется с помощью E1-подобного фермента Atg7 и переносится к Atg3 белку до его

конъюгации с фосфатидилэтаноламином и образования LC3-II формы (Klionsky, 2003). LC3-II белок вовлекается в растущую фагофору и располагается на внутренней и внешней мембране аутофagosомы. Преобразование LC3-I (18 кДа) в LC3-II (16 кДа) может быть использована для мониторинга аутофагии.

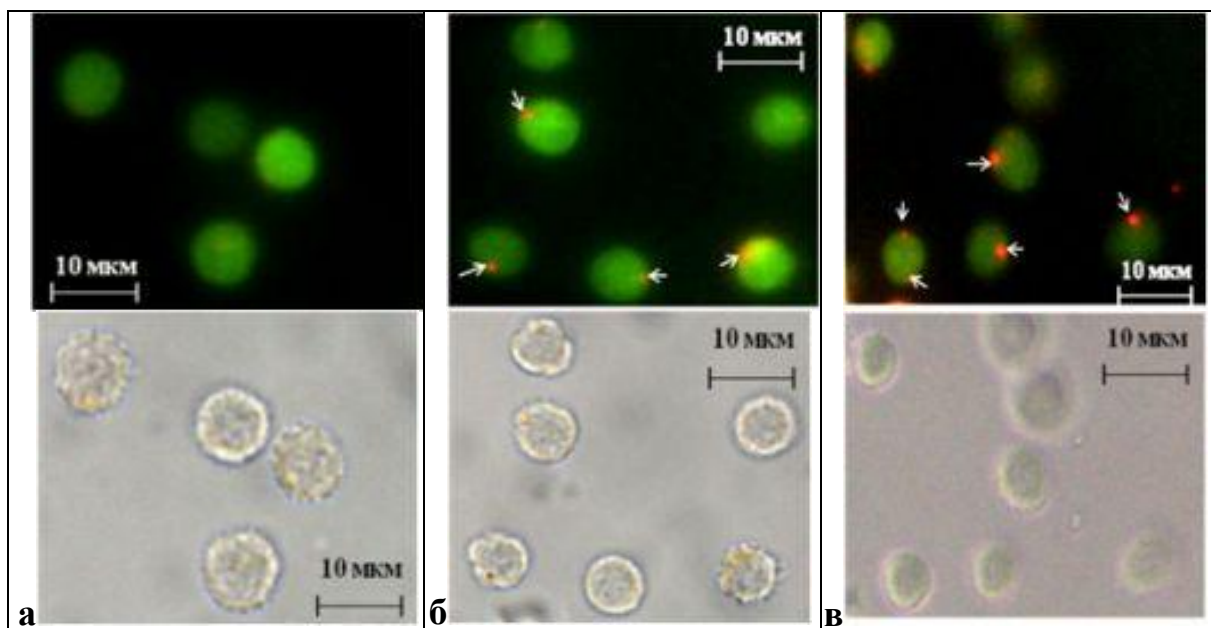


Рис. 14. Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови здорового донора и больных с различными формами atopической бронхиальной астмой в процессе культивирования (72 часа). Показана активация лизосом в Т-лимфоцитах: а) отсутствие лизосом в Т-лимфоцитах здорового донора; б) активация лизосом в Т-лимфоцитах больных легкой формой астмы; в) активация лизосом в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмы. Увеличение микрофотографий: x100. Клетки окрашены акридиновым оранжевым. Стрелками показаны лизосомы (оранжевый цвет).

Для детекции LC3-II белка Т-лимфоциты культивировали в течение 3 суток. Поскольку дексаметазон является индуктором апоптоза, мы также использовали этот глюкокортикоид для изучения его влияния на процесс аутофагии.

Результаты иммуноблоттинга согласовывались с результатами электронной и флуоресцентной микроскопий. Мы установили, что у здоровых доноров маркерный белок аутофагии присутствует в общей (LC3-I) форме, которая находится в цитоплазме и не связана с мембраной аутофagosом. При этом дексаметазон не оказывал влияния на образование LC3-II формы (рис. 15, лунки 2,3).

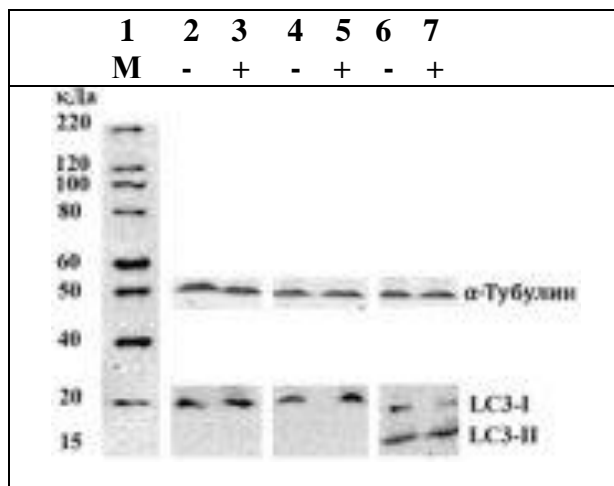


Рис. 15. Экспрессия LC3В белка в двух изоформах (I и II) в Т-лимфоцитах после 3 дней:
М – белковый маркер
2,3 - здоровый донор
4,5 – легкая форма АБА **6,7** – тяжелая форма АБА (+) - культивирования с дексаметазоном (-) - культивирования без дексаметазона.

В группе с легкой формой астмы LC3 белок представлен только I формой, и не обнаружено II формы белка, связанного с аутофагосомой (рис. 15, лунка 4). Можно предположить, что содержание LC3-II белка в клетках незначительно, что повлияло на его детекцию. Однако учитывая данные литературы о том, что запуск аутофагии связан с протеолитическим разрушением LC3 белка с образованием LC3-I формы (Kabeya, 2000), можно предположить, что процесс аутофагии в Т-клетках больных легкой формой астмы находится на стадии инициации.

Результаты исследования влияния дексаметазона на преобразование форм LC3 белка показали, что глюкокортикоид не отвечает за образование LC3-II белка, т.е. проявляет резистентность по отношению к формированию аутофагосом (рис. 15, лунка 5). Дополнительным подтверждением полученным результатам являются данные электронно-микроскопического изучения Т-лимфоцитов больных легкой формой заболевания, которые показали, что дексаметазон способствует интенсивной активации апоптоза клеток, но не аутофагии (рис. 10, г).

В лизатах клеток больных тяжелой формой астмы LC3 белок присутствовал и в форме I, и в форме II (рис. 15, лунка 6). Причем под воздействием дексаметазона большая часть LC3 белка преобразована во II форму (рис. 15, лунка 7).

Подводя итог по полученным результатам можно сказать, что стрессовые условия влияют на активацию аутофагии в Т-лимфоцитах больных астмой в отличие от здоровых доноров. Но проявления аутофагии были различными в зависимости от тяжести астмы.

Мы предполагаем, что в группе с легкой формой астмы изначально в Т-клетках активируется аутофагия и затем переходит в ПКГ II типа (аутофагическую гибель), компенсируя, таким образом, недостаточное проявление апоптоза.

В группе с тяжелой формой астмы интенсивная активация аутофагии на фоне снижения апоптотической активности является причиной длительного функционирования клеток и персистенции бронхиальной астмы.

Поэтому на следующем этапе исследований была поставлена задача провести анализ содержания белков теплового шока Hsp70 и Hsp90, которые могут выступать в качестве регуляторов программированной клеточной гибели в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой.

Оценка экспрессии белков теплового шока HSP70 и HSP90 в процессе культивирования Т-лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой

В результате проведенных исследований мы показали, что культивирование Т-лимфоцитов больных легкой формой астмой в течение 3 дней инициирует повышение внутриклеточного белка теплового шока Hsp90, в отличие от другого белка - Hsp70 (рис. 16, лунка 4). Схожая картина была отмечена и в клетках, которые культивировались с дексаметазоном (рис. 16, лунка 5).

В Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмой установлено повышение содержания как белка Hsp90, так и Hsp70 (рис. 16, лунка 6). Учитывая цитопротекторное свойство БТШ и результаты морфо-биохимических исследований Т-клеток можно предположить, что экспрессия Hsp90 и Hsp70 у больных тяжелой формой АБА приводит к торможению апоптоза и одновременной активации аутофагии. Дексаметазон снижал содержание обоих белков теплового шока в клетках (рис. 16, лунка 7), что сопровождалось повышением уровня апоптоза (рис. 7, 8).

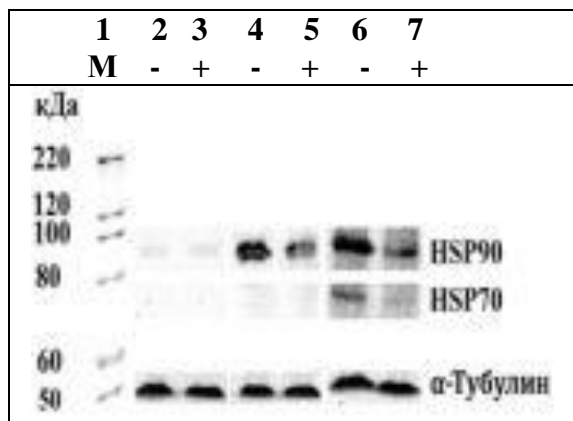


Рис. 16. Содержание внутриклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90 после 3 дней культивирования:

М – маркер

2, 3 - здоровый донор

4, 5 – легкая форма АБА

6, 7 - тяжелая форма АБА

«+» - культивирование с дексаметазоном.

«-» - культивирование без дексаметазона

Мы также проанализировали содержание белков теплового шока во всех исследуемых группах на 6 сутки культивирования (рис. 17). Сравнительный анализ белкового состава (HSP70 и HSP90) показал наличие белка теплового шока 90 в Т-лимфоцитах больных астмой с разной степенью тяжести заболевания. Установлено появление белка HSP70 только в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмой (рис. 17, лунка 6).

Культивирование Т-лимфоцитов с дексаметазоном в течение 6 суток снижало содержание БТШ у здоровых доноров и больных тяжелой формой астмой (рис. 17, лунки 3,7). В Т-лимфоцитах больных легкой формой астмой отмечено незначительное снижение экспрессии HSP90 (рис. 17, лунка 5). При этом содержание HSP70 не было установлено в Т-клетках, которые культивировались с дексаметазоном.

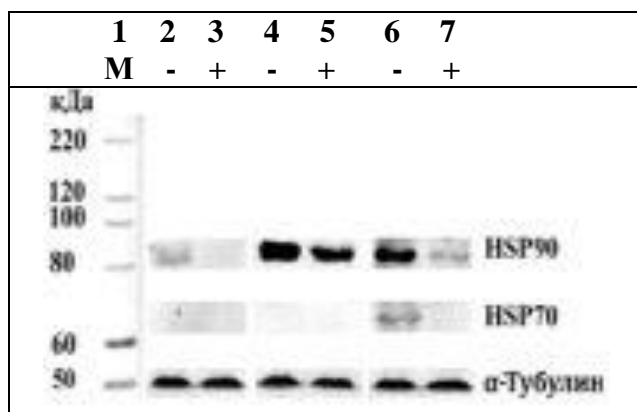


Рис. 17. Содержание внутриклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90 после 6 дней культивирования:

М – маркер

2, 3 - здоровый донор

4, 5 – легкая форма АБА

6, 7 - тяжелая форма АБА

«+» - культивирование с дексаметазоном

«-» - культивирование без дексаметазона

Ранее считалось, что белки теплового шока являются внутриклеточными белками, однако в последнее время доказано их существование во внеклеточной среде – в тканевых жидкостях человека и животных и кондиционной среде культур клеток (Евдонин, 2009).

Поскольку в клеточных лизатах белки HSP70 и HSP90 были установлены не во всех исследуемых группах, либо их содержание было не значительным, мы предположили, что это может быть связано с их выходом во внеклеточное пространство. С целью выяснения содержания внеклеточных белков теплового шока мы исследовали содержание культуральной среды, в которой находились Т-лимфоциты. Исследование проводилось на 3 и 6 сутки культивирования.

Проведенный анализ показал секрецию белка теплового шока 70 из Т-лимфоцитов во внеклеточную среду на 3 сутки культивирования в группе больных тяжелой формой астмой (рис. 18, лунка 6). Аналогичные результаты получены при культивировании клеток с дексаметазоном (рис. 18, лунка 6). Анализ культуральной среды, в которой

находились Т-лимфоциты здоровых доноров и больных легкой формой астмой, показал отсутствие внеклеточных белков у этих групп (рис. 18, лунки 2,3,4,5).

На 6 сутки культивирования Т-лимфоцитов больных тяжелой формой астмы выход HSP70 во внеклеточную среду сопровождался выходом другого шаперона – HSP90 (рис. 19, лунка 6). Присутствие дексаметазона в культуральной среде сказывалось на снижении внутриклеточного белка HSP90 и не влияло на содержание HSP70 (рис. 19, лунка 7). Результаты исследований двух других групп (здоровых доноров и больных легкой формой астмы) на 6 сутки культивирования совпадали с результатами, полученными на 3 сутки (рис. 19, лунки 2,3,4,5).

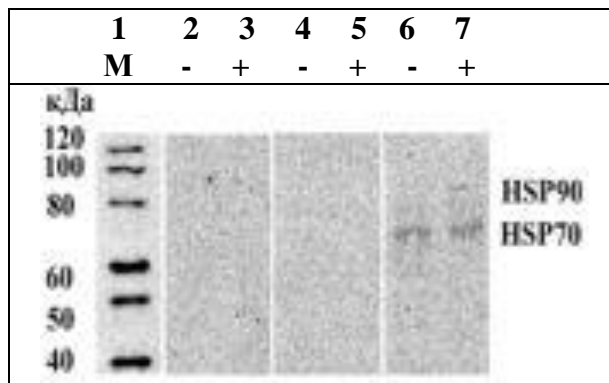


Рис. 18. Содержание внеклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в культуральной среде после 3 дней культивирования:

M – маркер
 2, 3 - здоровый донор
 4, 5 – легкая форма АБА
 6, 7 - тяжелая форма АБА
 «+» - культивирование с дексаметазоном
 «-» - культивирование без дексаметазона

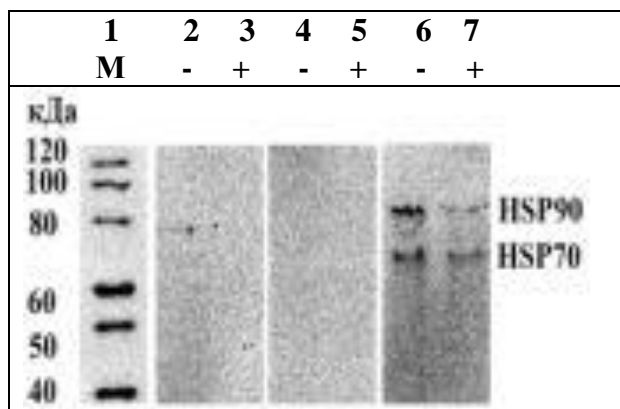


Рис. 19. Содержание внеклеточных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в культуральной среде после 6 дней культивирования:

M – маркер
 2, 3 - здоровый донор
 4, 5 – легкая форма АБА
 6, 7 - тяжелая форма АБА
 «+» - культивирование с дексаметазоном
 «-» - культивирование без дексаметазона

В настоящее время в литературе накапливаются сведения о том, что внеклеточный Hsp70 обладает множественными функциями (Евдонин, 2009). Показано, что растворимый рекомбинантный белок Hsp70 способен стимулировать пролиферацию НК-клеток, увеличивать их миграцию к опухолевым клеткам и цитолитическую активность против этих клеток (Multoff, 1999).

Опираясь на эти результаты можно предположить, что в случае периферической крови больных тяжелой формой астмы внеклеточный Hsp70 способен активировать НК-клетки и стимулировать их миграцию в зону воспаления, что приводит к уменьшению их содержания в периферической крови, в отличие от больных легкой формой АБА.

В отношении Hsp90 имеются данные относительно его роли в активации комплекса прекалликреин-кининоген на поверхности эндотелиальных клеток сосудов человека, который, как считается, участвует в развитии гиперреактивности бронхов при астме (Joseph, 2002).

Полученные результаты о содержании Hsp90 во внеклеточном пространстве больных тяжелой формой АБА в условиях *in vitro*, могут послужить основой более глубокого и детального изучения данного белка теплового шока *in vivo*.

Характеристика клеточного и гуморального звеньев иммунитета

На первом этапе исследования, мы определили содержание Т-клеток в периферической крови больных астмой и здоровых доноров. Результаты показали, что суммарное количество CD3 позитивных Т-лимфоцитов во всех исследуемых группах статистически не различалось ($p < 0,1$) (рис. 20).

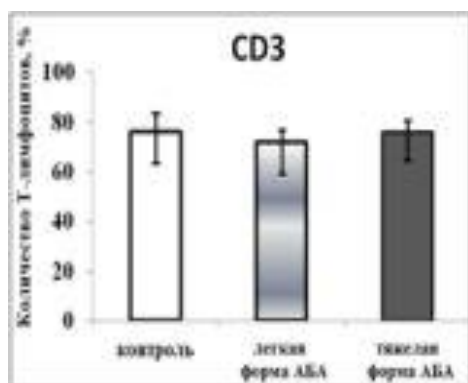


Рис. 20. Содержание CD3+ Т-лимфоцитов в периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой (АБА) и у здоровых доноров. Достоверных отличий между исследуемыми группами не было выявлено.

В случае клеточно-опосредованного иммунного ответа главная роль принадлежит CD8+ Т-лимфоцитам и натуральным киллерам (NK) (Ройт, 2007). Изменения в содержании этих клеток в группе с легкой формой АБА были незначительными и находились на уровне контроля (рис. 21). Однако необходимо отметить большой разброс индивидуальных показателей в содержании натуральных киллеров (рис. 21, б). При легкой форме АБА патологические изменения, лежащие в основе заболевания, выражены незначительно, реакция иммунной системы на антиген не носит постоянного характера, воспалительные явления минимальны. Именно этим может быть объяснен широкий разброс индивидуальных показателей и разнонаправленные изменения.

У больных с тяжелой формой АБА установлено достоверное снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток по сравнению с группами контроля и легкой формой астмы (рис. 21), что подтверждает участие клеточного звена иммунитета в патогенезе больных тяжелой формой АБА. Уменьшение количества натуральных киллеров даже до 4-5% менее чем в половине случаев сопровождается угнетением функциональной (цитотоксической) активности этих клеток. Снижение количества обоих типов цитотоксических клеток — как CD8+Т-лимфоцитов, так и CD16+/56+ NK-клеток при тяжелой форме атопической бронхиальной астмы связано с заболеванием и носит устойчивый характер.

В развитие бронхиальной астмы могут быть вовлечены различные иммунопатогенетические механизмы и клетки иммунной системы (Wills-Karp, 2004), одними из которых являются NKT-лимфоциты. NKT-клетки - уникальная популяция Т-лимфоцитов, характеризующаяся коэкспрессией рецепторов Т-клеток и различных рецепторов NK-клеток (Umetsu, 2010).

Мы установили, что в периферической крови всех исследуемых групп, присутствует популяция Т-лимфоцитов, коэкспрессирующая маркеры NK-клеток (рис. 22). Их содержание было значительно выше у больных тяжелой формой заболевания по сравнению с другими группами. В группе легкой формы астмы содержание NKT-клеток практически не отличалось от контроля. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что NKT-клеткам принадлежит одна из ключевых ролей в патогенезе тяжелой формы заболевания.

В развитии воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме важная роль принадлежит CD4+ Т-лимфоцитам (Zosky, 2009). Установлено, что большую часть CD4+ Т-клеток в очаге аллергического воспаления составляют Th2-лимфоциты (Colavita, 2000), которые продуцируют IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 и участвуют в формировании гуморального иммунного ответа (Колхир, 2010). Они имеют прямое отношение к феноменам, наблюдаемым при аллергии и бронхиальной астме.

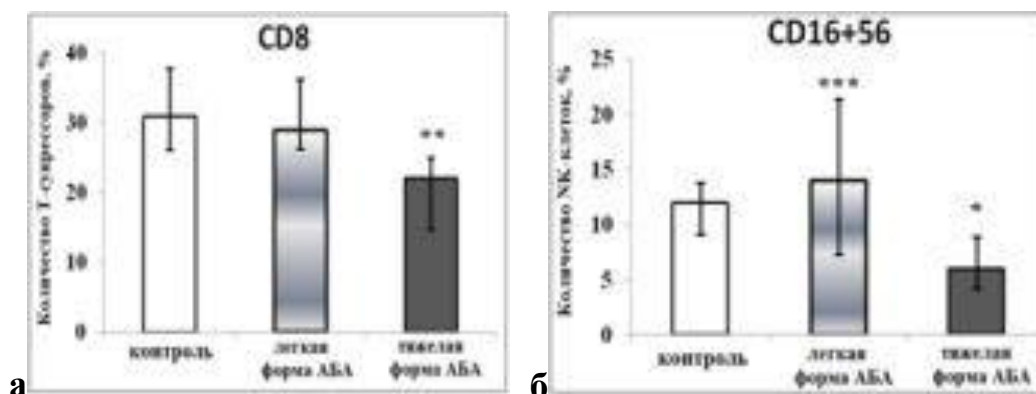


Рис. 21. Содержание (а) цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) и (б) натуральных киллеров (CD16+56+) в периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой (АБА) и здоровых доноров.

* достоверные отличия между группой больных тяжелой АБА и нормой ($p < 0,05$);

** достоверные отличия между группой больных тяжелой АБА по сравнению с двумя другими группами ($p < 0,05$);

*** достоверные отличия между группами с легкой и тяжелой АБА ($p < 0,05$).

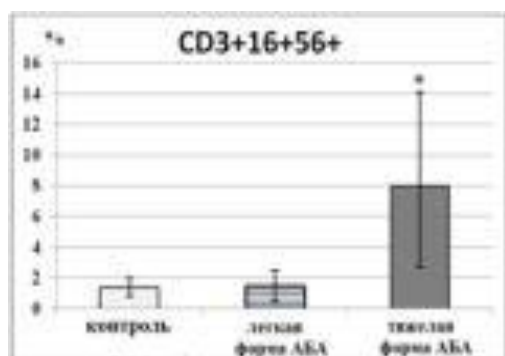


Рис. 22. Содержание НКТ-клеток (CD3+CD16+56+) в периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы (АБА) и здоровых доноров.

* достоверные отличия между группой больных тяжелой формой АБА и двумя другими группами ($p < 0,05$)

В нашей работе было проведено исследование содержания CD4+ Т-лимфоцитов в зависимости от степени тяжести астмы (рис. 23). Подсчет относительного числа CD4+ Т-лимфоцитов показал отсутствие изменений в численности данной субпопуляции у больных с легкой формой астмы по отношению к контрольной группе. Количество CD4+ клеток коррелировало с уровнем В-лимфоцитов, которое соответствовало норме, а содержание IgE, А, М и G в группе практически не отличалось от контроля (рис. 24). Несмотря на то, что активация гуморального иммунитета в группе с легкой формой заболевания выражена незначительно, имеется тенденция к повышению количества сывороточных иммуноглобулинов, на что указывает однонаправленный разброс значений, схожий с группой больных тяжелой формой АБА (рис. 24).

Увеличение количества CD4+ Т-лимфоцитов в группе с тяжелой формой АБА свидетельствует о значительной напряженности гуморального иммунитета (рис. 23). В сравнительном анализе иммуноглобулинов сыворотки крови больных тяжелой формой АБА установлено увеличение всех классов иммуноглобулинов, в частности IgE (рис. 24),

что связано с высоким уровнем CD4+ Т-клеток, стимулирующие синтез специфических IgE-антител В-лимфоцитами.

Результаты проведенных иммунологических исследований свидетельствует об изменении функционального статуса Т-клеток у больных с тяжелой формой астмы. Особенность иммунологической реактивности при тяжелой форме АБА, в отличие от группы контроля и легкой формы, связана со снижением активности клеточно-опосредованного иммунного ответа с участием цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. Снижение уровня CD8+ Т-лимфоцитов сопровождается повышением другой субпопуляции Т-клеток – CD4+. Увеличение содержания CD4+ Т-лимфоцитов коррелирует с повышением уровня В-лимфоцитов и иммуноглобулинов класса Е.

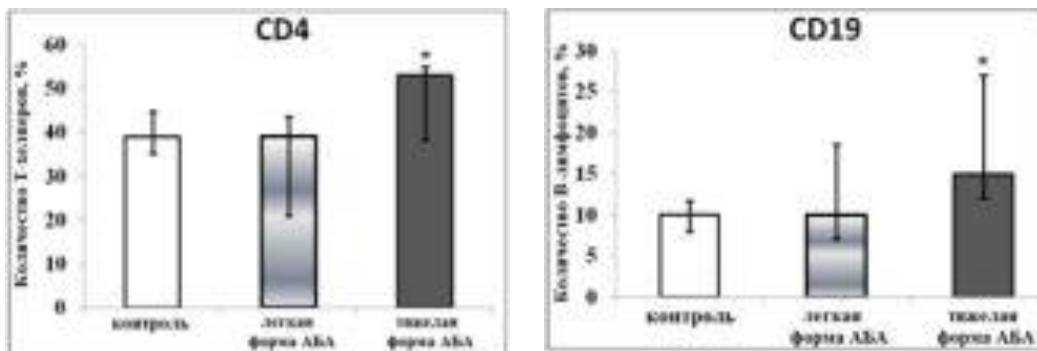


Рис. 23. Содержание CD4+ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов (CD19+) в периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы (АБА) и здоровых доноров.

* достоверные отличия по отношению к норме (p<0,05).

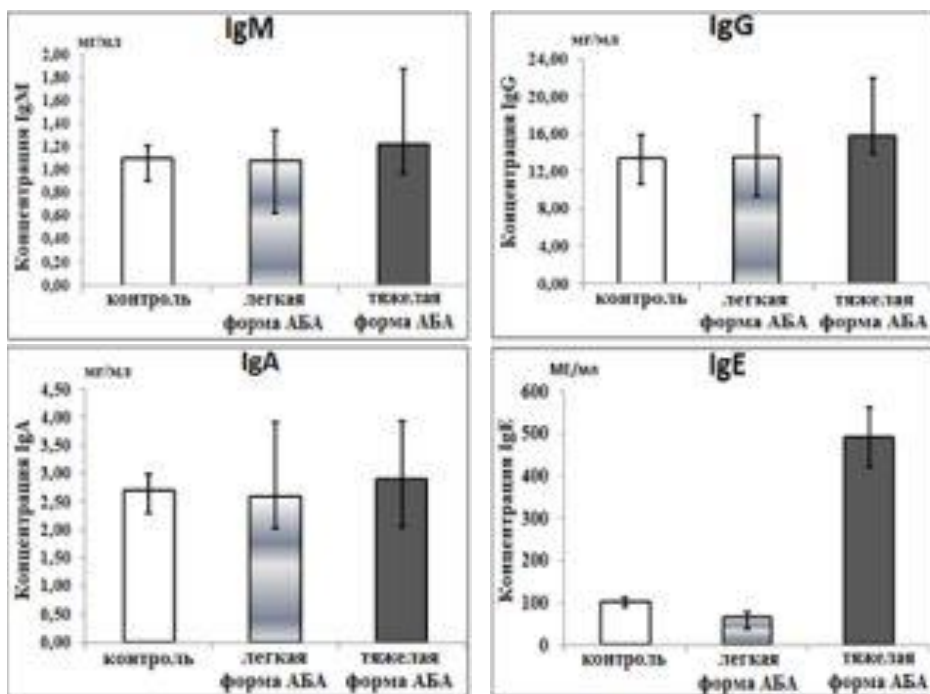


Рис. 24. Содержание иммуноглобулинов классов А, М, G и E в сыворотке крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой (АБА) и здоровых доноров.

Большое значение в оценке состояния иммунной системы имеет соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов (величина иммунорегуляторного индекса (ИРИ)) (Симонова, 2001). В литературе имеется много данных относительно изменения ИРИ при астме. Однако они очень противоречивы.

В нашем исследовании показатель ИРИ значительно менялся у больных с тяжелой формой АБА (рис. 25). Величина индекса у больных с легкой формой находилась на уровне контроля. Однако необходимо отметить больший разброс значений индивидуальных показателей, чем в контроле, что, видимо, свидетельствует об отсутствии однозначного ответа иммунной системы на антигенную стимуляцию.

Поскольку Т-клетки играют важную роль в иммунной реактивности, locus Т-клеточного рецептора уже давно считается важным кандидатом, восприимчивый к таким заболеваниям иммунной системы, как астма, атопия и аутоиммунные заболевания (Rottem, 2003). Концепция аутоиммунитета как одной из составляющих в развитии бронхиальной астмы признается не всеми авторами. Однако имеется ряд работ, подтверждающие участие аутоиммунных процессов в патогенезе данного заболевания (Мельницкая, 1973; Rottem, 2003; Ye, 2006).

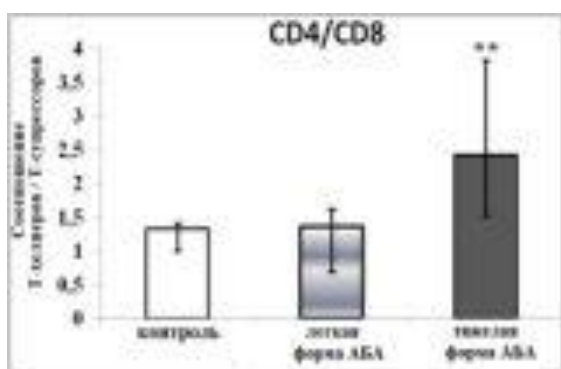


Рис. 25. Изменение соотношения CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы (АБА) и здоровых доноров.
** - достоверные отличия между группой больных тяжелой АБА по сравнению с двумя другими группами (p<0,01)

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что в сыворотке крови больных как легкой, так и тяжелой формой АБА наблюдается достоверное (p<0,05) по сравнению с контролем повышение уровня ЦИК. В частности наблюдалось повышение мелких и средних иммунных комплексов, которые играют важную роль в патологических процессах (рис. 26).

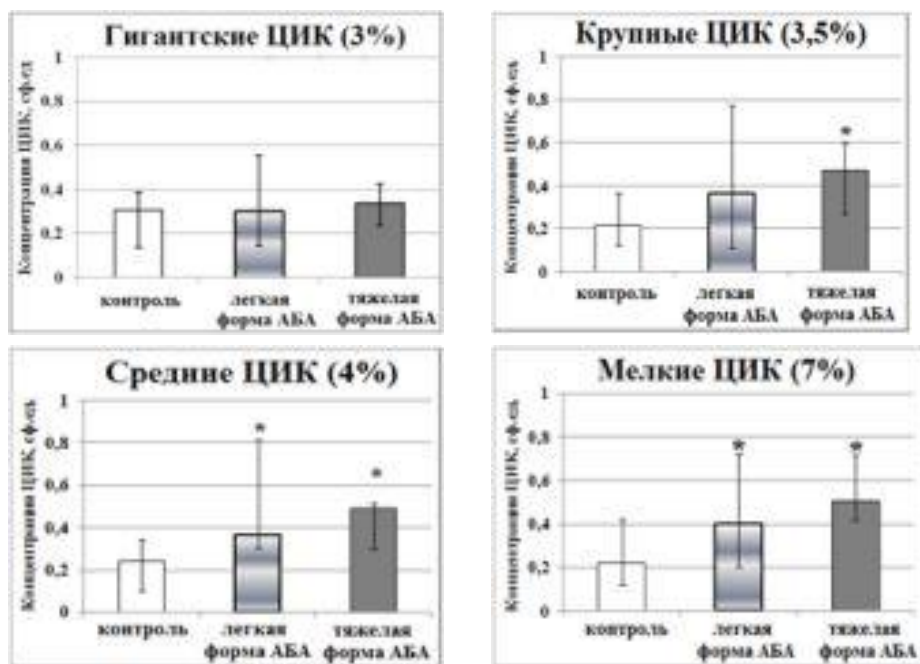


Рис. 26. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) гигантских, крупных, средних и мелких размеров в сыворотке крови здоровых доноров и больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой (АБА).
*Достоверные отличия по отношению к норме (p<0,05).

При исследовании содержания ЦИК во всех группах, было установлено, что соотношение концентраций ЦИК (коэффициент аутоиммунизации (K_A)) в сыворотке

больных АБА по отношению к здоровым донорам возрастало (по медиане) линейно с уменьшением размера ЦИК.

При легком течении АБА: коэффициент K_A гигантских ЦИК (3%) увеличивался в 0,96 раз; крупных ЦИК (3,5%) - в 1,6 раз; K_A средних ЦИК (4%) - в 1,51 раз; K_A мелких ЦИК (7%) - в 1,86 раз.

При тяжелом течении АБА: коэффициент K_A гигантских ЦИК (3%) увеличивался в 1,06 раз; K_A крупных ЦИК (3,5%) - в 2 раза; K_A средних ЦИК (4%) - в 2,03 раза; K_A мелких ЦИК (7%) - в 2,30 раза.

Если коэффициент K_A выше 1,5, то наличие аутоиммунного компонента становится достоверным. Таким образом, у больных с легкой и тяжелой формами АБА установлено участие иммунопатологических реакций в патогенезе заболевания.

При оценке патогенности ЦИК мы установили, что коэффициент патогенности достоверно ($p < 0,05$) повышается у больных АБА по отношению к контрольной группе (рис. 27). Выявленное повышение уровня ЦИК мелких и средних размеров в сыворотке больных АБА, а также повышение иммунорегуляторного индекса у больных тяжелой формой АБА до 2,5 может быть показателем предрасположенности этой категории больных к развитию аутоиммунных реакций.



Рис. 27. Содержание патогенных субфракций в популяции ЦИК в группе контроля и больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмой (АБА).

*Достоверные отличия по отношению к норме ($p < 0,05$).

Концепция относительно роли программированной клеточной гибели в патогенезе атопической бронхиальной астмы, несмотря на обширные данные литературы, оставалась не до конца изученной и противоречивой. Повышенный в последние годы интерес к процессу аутофагии при различных физиологических и патологических состояниях стал основой для ее изучения в представленной работе. Полученные результаты позволяют говорить, что процесс ПКГ Т-лимфоцитов при развитии бронхиальной астмы не так однозначен, как считалось ранее. Помимо апоптоза, свой вклад в патологическое развитие астмы может вносить аутофагия. А в качестве регуляторов переключения с одной программы гибели на другую могут выступать белки теплового шока Hsp70 и Hsp90.

ВЫВОДЫ

1. Установлено слабое проявление биохимических признаков спонтанной апоптотической активности Т-лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой *in vitro*. Чувствительность Т-клеток к индуцированному апоптозу снижалась с увеличением тяжести заболевания;

2. В Т-лимфоцитах больных атопической бронхиальной астмой показана активация аутофагии: в группе с легкой формой заболевания аутофагия приводит к гибели Т-лимфоцитов по пути программированной клеточной гибели II типа. В группе с тяжелой формой астмы аутофагия способствует устойчивости клеток к гибели и их длительному функционированию;

3. У больных легкой формой астмы дексаметазон ингибирует аутофагию в Т-лимфоцитах, а у больных с тяжелой формой заболевания способствует интенсивной активации процесса;

4. Установлено повышение содержания внутриклеточного белка Hsp90 в Т-лимфоцитах больных легкой формой астмы в процессе культивирования. В Т-лимфоцитах больных тяжелой формой бронхиальной астмы экспрессия внутриклеточного Hsp90, сопровождалась экспрессией Hsp70;

5. Показано, что устойчивость Т-лимфоцитов к апоптозу совпадает с повышением содержания внутриклеточного белка HSP90 в Т-лимфоцитах больных легкой формой АБА;

6. Ингибирование апоптоза (ПКГ I типа) Т-лимфоцитов в условиях стресса (истощение питательных веществ) у больных тяжелой формой астмы сопровождается повышением содержания внутриклеточных белков теплового шока (HSP70 и HSP90) и их секрецией во внеклеточное пространство;

7. Установлено изменение субпопуляционного состава лимфоцитов у больных тяжелой формой астмы: при торможении апоптоза, ведущего к накоплению Т-лимфоцитов, происходит увеличение содержания CD4+ Т-клеток, что приводит к активации гуморального звена иммунитета. Повышение уровня ЦИК мелких и средних размеров является показателем предрасположенности этой категории больных к развитию аутоиммунного ответа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Скибо Ю.В. Индукция аутофагии в Т – лимфоцитах периферической крови больных атопической бронхиальной астмой / Ю.В. Скибо, А.А. Пономарева, И.Д. Решетникова, З.И. Абрамова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.VII. - №3. – С.146 – 150. (перечень ВАК), автор – 0,3пл.
2. Скибо Ю.В. Особенности апоптоза лимфоцитов у больных легкой и тяжелой атопической бронхиальной астмой / Ю.В. Скибо, Н.Ш. Курмаева // Практическая медицина. – 2012. - № 6(61). – С. 62–68. (перечень ВАК), автор – 0,3 пл.
3. Скибо Ю.В. Структура основных популяций лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой разной степени тяжести / Ю.В. Скибо, Н.Ш. Курмаева, В.Н. Цибулькина, З.И. Абрамова // Практическая медицина. – 2012. - №9(65). – С. 170-177. (перечень ВАК), автор – 0,25 пл.
4. Скибо Ю.В. Содержание НКТ клеток в периферической крови больных легкой и тяжелой атопической бронхиальной астмой / Ю.В. Скибо, Н.Ш. Курмаева, В.Н. Цибулькина, З.И. Абрамова // Российский иммунологический журнал. - 2012. – № 6(14). - №3(1). – С. 135-136.(перечень ВАК), автор – 0,18 пл.
5. Skibo Y.V. Adhesion force of T-lymphocytes in the pathogenesis of patients with light and severe bronchial and atopic asthma / Y.V. Skibo, C.J.A. Vodounon, M.V. Morozov, B.M. Lamine, Z.I. Abramova et al. // Int J Biol Med Res. – 2012. – V. 3(3). – P: 2138-2146.
6. Vodounon A.C. Morphological and biochemical characteristics of apoptosis lymphocytes of peripheral blood in the pathogenesis of bronchial and atopic asthma of light and serious severity / A.C.Vodounon, **Y.V.Skibo**, Z.I.Abramova [et al.]// Research and Reviews in BioSciences. - 2012. – V. 6 - I.8. - P.210 – 220.
7. Vodounon C.J.A. The implication of morphological characteristics in the etiology of allergic asthma disease and in determining the degree of severity of atopic and bronchial asthma / C.J.A.Vodounon, B.M. Lamine, **Y.V. Pynthyk**, S. Alphonse, Z.I. Abramova // Asian Journal of cell biology. – 2011. – V. 6(2). – P: 65-80.

8. Пинчук Ю.В. Особенности программируемой клеточной гибели лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, И.Г. Мустафин, З.И. Абрамова // Российский аллергологический журнал. – 2010. - №4. – 32-39.(перечень ВАК), автор – 0,2 пл.
9. Пинчук Ю.В. Биохимические и морфологические изменения лимфоцитов при апоптозе у больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, М.М.Д. Нсангу, И.Г. Мустафин, А.А. Пономарева, З.И. Абрамова // Вестник Оренбургского Государственного Университета – 2008. – №11. – С.159 – 166. (перечень ВАК), автор – 0,3 пл.
10. Пинчук Ю.В. Апоптоз лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой. Его морфологические и биохимические изменения / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, И.Г. Мустафин, А.А. Пономарева, З.И. Абрамова //Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем». – Казань. – 2008. – № 4,А. – С. 420 – 431.
11. Абрамова, З.И. Патогенез и программируемая гибель клетки: особенности апоптоза лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой / З.И. Абрамова, **Ю.В. Скибо**. // Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины.- Казань: Изд-во Казанского университета, 2012. – С. 390-405.
12. Скибо Ю.В. Бронхиальная астма. Иммунологические аспекты заболевания. Патологическое нарушение в развитии лимфоцитов больных Атопической Бронхиальной Астмой / Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова, С.А.Д. Водунон // LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co.KG. – Saarsbrucken: Germany, 2011. – 104 стр.
13. Скибо Ю.В. Аутофагия лимфоцитов при развитии atopической бронхиальной астмы / Ю.В. Скибо З.И.Абрамова // Здоровье человека в XXI веке: Сб. научных статей под ред.Ксембаева С.С. - Казань, 2012.- С.741-746.
14. Kurmaeva, N.The content of natural killer T cells in the peripheral blood of patients with mild and severe atopical asthma/N.Kurmaeva, **Yu.Skibo**, V.Tsybulkina, Z.Abramova, A.Luntsov //International Severe Asthma Forum (ISAF). - Sweden, 2012.-P.22.
15. Скибо Ю.В. Характеристика апоптоза и аутофагии Т-лимфоцитов в зависимости от степени тяжести бронхиальной астмы/ Ю.В. Скибо З.И.Абрамова // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий: Сб. трудов III Международной Интернет-конференции – Казань, 2012. – С. 260- 262.
16. Skibo Y.V. Dynamic adhesion of T-lymphocytes from patients with bronchial asthma revealed by atomic force microscopy/Y.Y.Skibo, Z.I.Abramova//The 4th Int. IMBG conference for young scientists "Molecular biology: Advances and perspectives". –Ukraine, 2011.-P.163.
17. Скибо Ю.В. Особенности программируемой клеточной гибели лимфоцитов при развитии бронхиальной астмы/ Ю.В. Скибо З.И.Абрамова // Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии: Сб.трудов I Всерос. интернет-конференции. – Казань, 2010. – С. 143-147.
18. Пинчук Ю.В. Морфологические нарушения апоптоза лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. - Казань, 2008.-С.104-105.
19. Пинчук Ю.В. Морфологические изменения лимфоцитов периферической крови больных atopической бронхиальной астмой/ Ю.В. Пинчук, З.И. Абрамова // Дни иммунологии в Санкт-Петербурге: Сб. материалов XIII Всероссийского форума с международным участием им. академика В.И.Иоффе. - Санкт-Петербург, 2009. – С. 245-246.
20. Пинчук Ю.В. Анализ апоптоза лимфоцитов больных бронхиальной астмой /Ю.В. Пинчук, З.И. Абрамова // Симбиоз Россия 2009: материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. - Пермь, 2009. – С. 312-314 с.
21. Пинчук Ю.В. Нарушение программируемой клеточной гибели при развитии бронхиальной астмы/ Ю.В. Пинчук, З.И. Абрамова // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: Сб. материалов X международного конгресса. – Казань, 2009. – С. 78-79.
22. Пинчук Ю.В. Патологическое нарушение в развитии и удалении лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой/Ю.В. Пинчук, З.И. Абрамова//Сб.материалов XVI Международной конференции студентов,аспирантов и молодых учёных.–Москва,2009. – С.29-30.

23. Пинчук Ю.В. Особенности биохимических и морфологических показателей лимфоцитов при апоптозе у больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Сборник трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. - Новосибирск, 2008. - С.775.
24. Пинчук Ю.В. Морфологические нарушения апоптоза лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии. Материалы научно-практической конференции. Казань, 15-16 сентября 2008 г., Казань, 2008. - С. 104-105.
25. Пинчук Ю.В. Биохимические и морфологические изменения лимфоцитов при апоптозе у больных atopической бронхиальной астмой / Ю.В. Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Санкт-Петербургские научные чтения – 2007: Сб. материалов II Международного молодежного медицинского конгресса. - Санкт-Петербург, 2007. – 17- 18.
26. Водунон А.С. Влияние дексаметазона на степень деградации ДНК лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой/ А.С. Водунон, **Ю.В. Пинчук**, З.И. Абрамова // Санкт-Петербургские научные чтения – 2007: Сб. материалов II Международного молодежного медицинского конгресса. - Санкт-Петербург, 2007. – С. 18- 19.
27. Скибо Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели: учебно-методическое пособие для магистров по курсу "Теория апоптоза"/ Рекомендовано УМО РАЕ по классическому университетскому и техническому образованию в качестве учебника для студентов ВУЗов, обучающихся по направлению подготовки: 020200.68-"Биология" (Магистратура)/Ю. В. Скибо, З.И. Абрамова.- Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011.-56с.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, к 104В, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru