

Пинчук Ю.В. *, Водунон А.С. *, Абрамова З.И. *,
Дезире Д.М.М. *, Мустафин И.Г. **, Пономарева А.А. ***

*Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова – Ленина,

**Казанский государственный медицинский университет,

***Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АПОПТОЗЕ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Установлены морфологические признаки и биохимические нарушения апоптоза лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой, коррелирующие с тяжестью заболевания. Полученные данные могут быть новыми интегративными критериями при установлении тяжести течения астмы.

Введение

Основным принципом функционирования физиологических систем является поддержание биологической целостности организма. На клеточном уровне данный процесс реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, которые поддерживают сложное состояние равновесия между интегративными физиологическими процессами: пролиферацией, дифференцированием и программируемой клеточной гибелью (ПКГ). Исследование физиологической клеточной гибели в данном контексте представляет собой новый этап развития медико-биологических наук [1, 7, 20]. Следует отметить, что такая форма клеточной смерти отождествляется с апоптозом: разница в обозначениях отражает способы идентификации гибели – биохимический в первом и морфологический во втором случае. Принципиальным отличием апоптоза является то, что в процессе подготовки клетки к гибели плазматическая мембрана этой клетки, как правило, сохраняет свою целостность, и остатки клеток могут быть поглощены макрофагами или соседними клетками. Клетка требует обязательного наличия АТФ, изменение его уровня может изменить направление клеточной гибели, причем решающим может являться даже не абсолютное содержание АТФ, а отношение АТФ/АДФ в клетке [3]. ПКГ привлекает к себе внимание по двум причинам. Во-первых, она играет важную роль в морфогенетических процессах и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма [7, 11]. Во-вторых, что особо актуально, возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями ПКГ, при которых

клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей или астмы. Связано это с тем, что апоптоз не справляется со своей задачей или же имеются нарушения в самом процессе? По мнению некоторых авторов [12, 20] возникновение астмы обусловлено нарушением процесса апоптоза лимфоцитов. В связи с этим интересно изучить морфологию лимфоцитов на различных этапах развития заболевания ее связь с биохимическими процессами.

Материалы и методы

Объектом исследований явились Лф периферической крови больных БА и условно здоровых доноров. Группу больных БА составили лица с легкой и средне-тяжелой формами заболевания на момент забора крови не получавшие кортикостероиды. Больные находились на стационарном лечении в пульмонологическом отделении РКБ МЗ РТ г. Казани, Российской Федерации.

Получение лимфоцитов. Периферическую кровь из локтевой вены в объеме 6 мл отбирали в пробирку, содержащую гепарин – Na (EUROTUBO, Spain). Исследуемую пробу разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в равных соотношениях и наслаивали на 6 мл градиента плотности фиколл-верографина. Центрифугировали в течение 40 мин в бакет-ротаторе при 3000 об/мин при 4° С (К-24). К суспензии лимфоцитов (3-4) мл добавляли (3-4) мл ФСБ, содержимое тщательно перемешивали. Образцы центрифугировали при 2000 об/мин (К-24) при 20°С в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость удаляли, а процедуру отмывки повторяли еще раз [15].

Фиксирование лимфоцитов для электронной микроскопии. После центрифугирования полученный осадок из лимфоцитов фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 2 часов и 1% раствором OsO_4 на том же буфере с добавлением сахарозы (25 мг/мл) (2 часов). Далее образцы дегидратировали в этаноле восходящей концентрации (30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 96°), ацетоне и окиси пропилену. Материал заливали эпоксидной смолой Эпон – 812. Полимеризовали образцы в течение трех суток в термостате при температуре 37, 45 и 60°C, соответственно.

Срезы получали на ультрамикротоме LKB-III (Швеция), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата 20 минут при 60°C, затем 10 минут раствором цитрата свинца. Препараты просматривались на электронном микроскопе Hitachi -125 (Япония).

Культивирование лимфоцитов. К полученному осадку лимфоцитов добавляли среду RPMI 1640 из расчета на 1 лунку 1 мл клеточной суспензии. После растворения осадка образцы переносили в планшет и добавляли 10% эмбриональную телячью сыворотку. Клетки инкубировали с дексаметазоном (10^{-2} М) (конечная концентрация 10^{-4} М). Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5%-ным CO_2) в течение 1-6 суток. Оценку апоптоза лимфоцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборах Facscan и FacsCalibur (“Becton Dickinson”) с использованием нескольких методов, включая определение фрагментации ДНК по выявлению гиподиплоидного пика при окраске PI, выявление экспрессии фосфатидилсерина на поверхности Лф флуоресцентной меткой меропцианин 540 (MC540), измерение митохондриального потенциала клеток по интенсивности флуоресценции CMX-Ros.

1. Изменение величины митохондриального потенциала (МП) измеряли с помощью флуорохрома CMX-ROS. Величину $\Delta\Psi_m$ с использованием флуорохрома CMX-Ros (“Molecular Probes”) определяли следующим образом: 50 мкг CMX-Ros растворяли в 1 мл ДМСО, разливали на аликвоты по 20 мкл и хранили при -25°C (маточный раствор) [12].

Непосредственно перед окрашиванием клеток к маточному раствору CMX-Ros добавляли 40 мкл ФСБ (pH 7,3) и перемешивали. Полученный раствор в объеме 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^6 кл/мл среды (конечная концентрация CMX-Ros 5 мкг/мл). Суспензию тщательно перемешивали и инкубировали в темноте 30 мин при 37° С в полистирольных пробирках для цитофлуориметрии 12×75 мм (Falcon 2052). Регистрацию результатов проводили на третьем детекторе флуоресценции FL3 (красная область спектра). На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток. Мертвые клетки исключали из исследования на основании параметров их прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

2. Экспрессию фосфатидилсерина (ФС) определяли с помощью флуорохрома MC 540. Маточный раствор MC540 (концентрация 1 мг/мл) в объеме 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 10^6 кл/мл (конечная концентрация MC540 5 мкг/мл) [13]. Клеточную суспензию перемешивали и инкубировали в течение 5 минут в темноте при комнатной температуре в полистирольных пробирках 12×75 мм (Falcon 2052). Регистрацию результатов осуществляли на втором детекторе FL2 цитометра. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток. Мертвые клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

3. Определение фрагментации ДНК. Фрагментацию ДНК определяли по наличию гиподиплоидного пика, характерного для апоптоза, оцениваемого с помощью флуорохрома пропидия йодида (PI) (“Sigma”) [14]. Для этого клетки, предварительно фиксированные в течение 1 часа 70° этиловым спиртом и отмытые ФСБ, окрашивали на ДНК при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте гипотоническим раствором PI, содержащим 0,1% тритона X-100 и 0,1% цитрата натрия, в полистирольных пробирках 12×75 мм (Falcon 2052). Определяли процент клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне гистограммы (2), располагающегося левее основного пика (1), соответствующего диплоидным клеткам. В гиподиплоидной зоне локализуются клетки, подвергшиеся

апоптозу. В ряде случаев наблюдали пик, распадавшийся правее основного (диплоидного) пика, определяемый как тетраплоидный. Данный пик рассматривали как показатель пролиферативной активности. Регистрацию результатов проводили на втором детекторе флуоресценции – FL2. Для анализа проводили подсчет не менее 10 000 клеток.

Выделение ДНК. В полипропиленовые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл вносили по 500 мкл суспензии лимфоцитов и 1 мл денатурирующего раствора холодного сахарозного буфера содержащего: 0,32 М сахарозы, 5 мМ $MgCl_2$, 0,01 М Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 М $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,2 мМ EGTA, 1 мМ PMSF, 1% тритон X-100 и выдерживали 10 мин при комнатной температуре.

Образец центрифугировали при 3000 об/мин, при 4°C в течение 15 мин. Сливали супернатант и ресуспендировали ядерный осадок в 400 мкл буфера для протеиназы К, добавляли 20 мкл 10% додецилсульфата Na (SDS) до конечной концентрации 0,5%. Через 5 мин добавляли 5 мкл раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл (конечная концентрация – 250 мкг/мл). Инкубировали с протеиназой К в течение 12 ч при 37°C, либо – 3 ч при 55°C. По окончании инкубации добавляли 400 мкл забуференного фенола, осторожно перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

Верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 400 мкл смеси фенол : хлороформ (1:1). Перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. Вторично верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 400 мкл хлороформа. Образец перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. Третий раз верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку, и к раствору ДНК добавляли последовательно 40 мкл 3 М ацетата Na (1/10 объема) и 800 мкл охлажденного 96% этанола (2 объема). Образец центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Промывали осадок 1 мл 70% этанола. Образец повторно центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин. Осадок подсушивали при комнатной температуре и растворяли ДНК в ТЕ буфере (в течение ночи при

комнатной температуре). Состав ТЕ буфера: 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4; 1 мМ EDTA, pH 8,0.

Электрофорез в агарозном геле. Пробы ДНК (1-10) мкл смешивали с 2 мкл бромфенолового синего и вносили в лунки 1% агарозного геля. Электрофорез вели в горизонтальном направлении на пластинах размером 10 × 11 × 3 мм при напряжении 5 В/см, в течение 3,5 ч при 20°C. По окончании электрофореза гель окрашивали в течение 40 мин раствором бромистого этидия (2 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете (видеосистема для регистрации гелей “DNA Analyzer”).

Результаты и обсуждение

Отличительной морфологической особенностью апоптоза без патологии является коллапс ядра. Хроматин, который в норме представлен открытыми конденсированными областями (гетеро- и эухроматин) становится суперконденсированным в виде полусфер или глыбок, иногда принимающих форму полумесяца, располагаясь по периферии ядра. В этот момент начинается фрагментация ДНК хроматина. По данным литературы [8] на стадии конденсации хроматина и инвагинации ядерной мембраны апоптотических клеток в норме происходит деградация ДНК с образованием фрагментов до 30 т. п. о., затем наступает этап межнуклеосомной фрагментации ДНК (кратная 200 п.о.).

Метод трансмиссионной электронной микроскопии, позволил нам выявить морфологические отличия лимфоцитов контрольной группы и больных с АБА. Ряд клеточных структур, особенно контуры ядра и хроматин, плазматическая мембрана лимфоцитов больных с АБА имели явные морфологические изменения, которые находились в прямой зависимости от тяжести заболевания.

Как следует из рисунка 1, А лимфоциты условно здоровых доноров имеют правильную округлую форму. Клеточная мембрана ровная, без выпячиваний и инвагинаций. Ядро, как правило, занимает большую часть клетки, округлой формы, расположено центрально: в нем заметны ядрышки, локализация хроматина периферическая, кариоплазма электронно-светлая. Все мембранные структуры целостны и хорошо прорисованы – митохондрии правильной формы с хорошо за-

метными кристами. Чаще всего, скопления митохондрий наблюдается медиально, недалеко от ядра. В цитоплазме различимы рибосомы, эндоплазматический ретикулум и довольно крупные гранулы.

В то же время среди лимфоцитов здоровых доноров встречались отдельные клетки с признаками апоптотической смерти (АСК): ядра приобретают лопастной вид, по данным литературы, обычно далее происходит его коллапс и распад на микроядра.

Морфология лимфоцитов лиц с atopией (легкая и тяжелая АБА) довольно значительно отличается (рис. 1, Б и В) от лимфоцитов условно здоровых доноров. Клетки больных с легкой формой АБА имеют не правильную форму: на клеточной поверхности появляются выросты (пили) и глубокие инвагинации. Ядра имеют ярко выраженный лопастной вид. Хроматин конденсированный и расположен по его периферии. Места прикрепления участков хромосом, несущих гетерохроматиновые блоки, как правило, связаны с особой функциональной активностью тех или иных участков генома.

Ассоциированная с мембраной ДНК имеет более высокий уровень повторяющихся последовательностей, чем основная часть ядерной ДНК. В результате апоптоза в первую очередь страдает именно эта часть молекул ДНК, примыкающая к ядерной мембране.

Как следует из рисунка 1, В структура лимфоцитов периферической крови больных средне-тяжелой формой АБА выражено отлична как от здоровых клеток, так и клеток больных легкой формой астмы. Обнаруживаются довольно глубокие вдавливания ядерных мембран, вплоть до фрагментации ядер. Встречаются фрагменты ядра (3-4) ограниченные мембраной внутри клетки. Т.е. ядро уже распалось, а клетка осталась целой. Это уже говорит о том, что произошли нарушения в процессе апоптоза. Среди тонких ультраструктурных изменений, характерных для поздних стадий апоптоза, обнаружены изменения цитолеммы и поверхностных структур. В первую очередь утрата микроворсинок и десмосом. На клеточной мембране появляются выпячивания и пузыри, получившие назва-

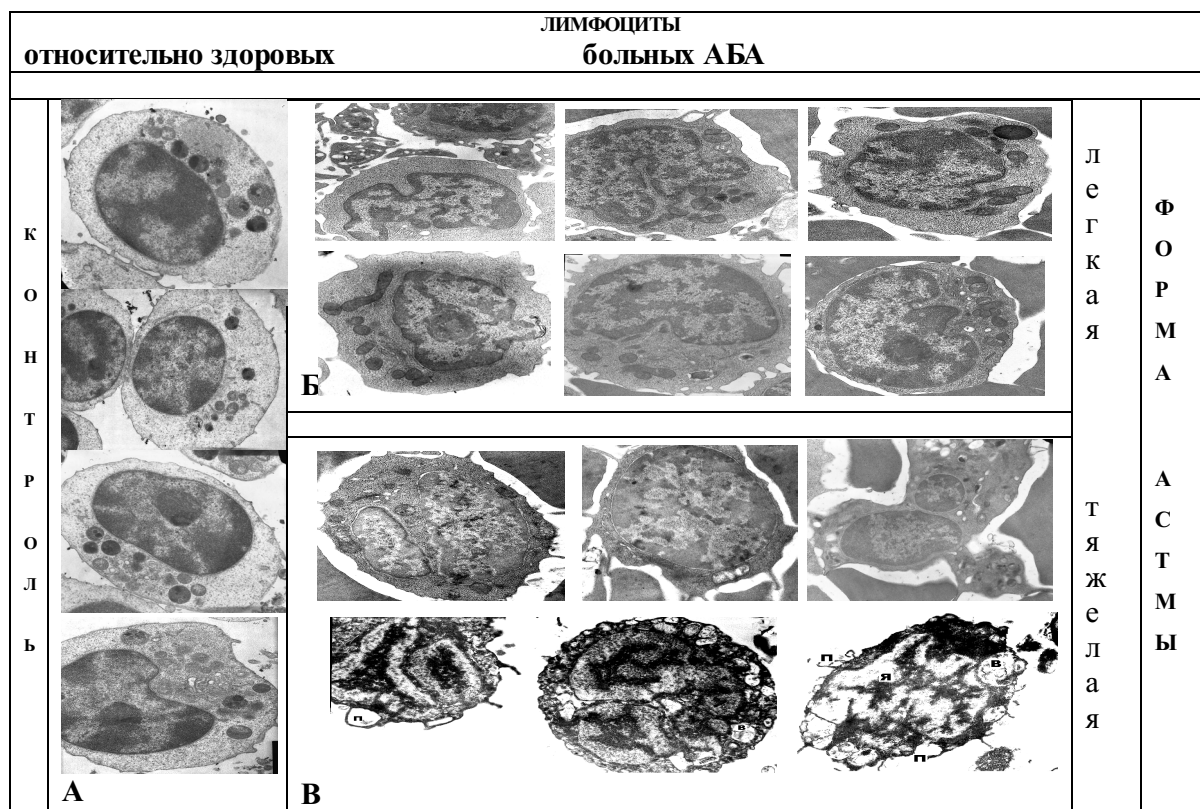


Рисунок 1. Лимфоциты периферической крови условно здоровых лиц и лиц с АБА:
А – норма, Б – легкая, В – тяжелая степень заболевания

ние «блеbbing» [7]. Развитие блеббинга мембраны представляет собой результат нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий вследствие активации специфических ферментативных реакций, окислительного повреждения белков цитоскелета, развития при мембранного энергетического и ионного дисбаланса [3,4]. Нет четко видимых мембранных структур клетки – митохондрий, ЭПР, однако, наблюдается большое количество везикул с электронно-светлым содержимым, мультисламеллярные тела, а также гранулы с содержимым средней электронной плотности. Часто в цитоплазме таких лимфоцитов наблюдаются электронно-светлые крупные вакуоли. Но целостность мембран не нарушена.

Таким образом, у больных с тяжелой формой АБА обнаружены лимфоциты с призна-

ками позднего апоптоза, нераспавшиеся на апоптотические тельца. Что может быть свидетельством нарушения биохимического (нуклеазного) состава лимфоцитов, с другой стороны этот факт можно объяснить и быстрым фагоцитозом апоптотических телец.

Известно, что при апоптозе ДНК деградирует с образованием упорядоченных фрагментов, которые обнаруживаются по увеличению гиподиплоидной зоны на гистограммах (рис.2). Нами установлено, что лимфоциты условно здоровых лиц в процессе культивирования отвечают появлением апоптотических клеток как при спонтанном (9-18)%, так и Дн-индуцированном (15-43)%) апоптозе на 3 и 6 сутки, соответственно. В культуре лимфоцитов больных АБА процент апоптотирующих клеток изменялся незначительно (рис. 2,В).

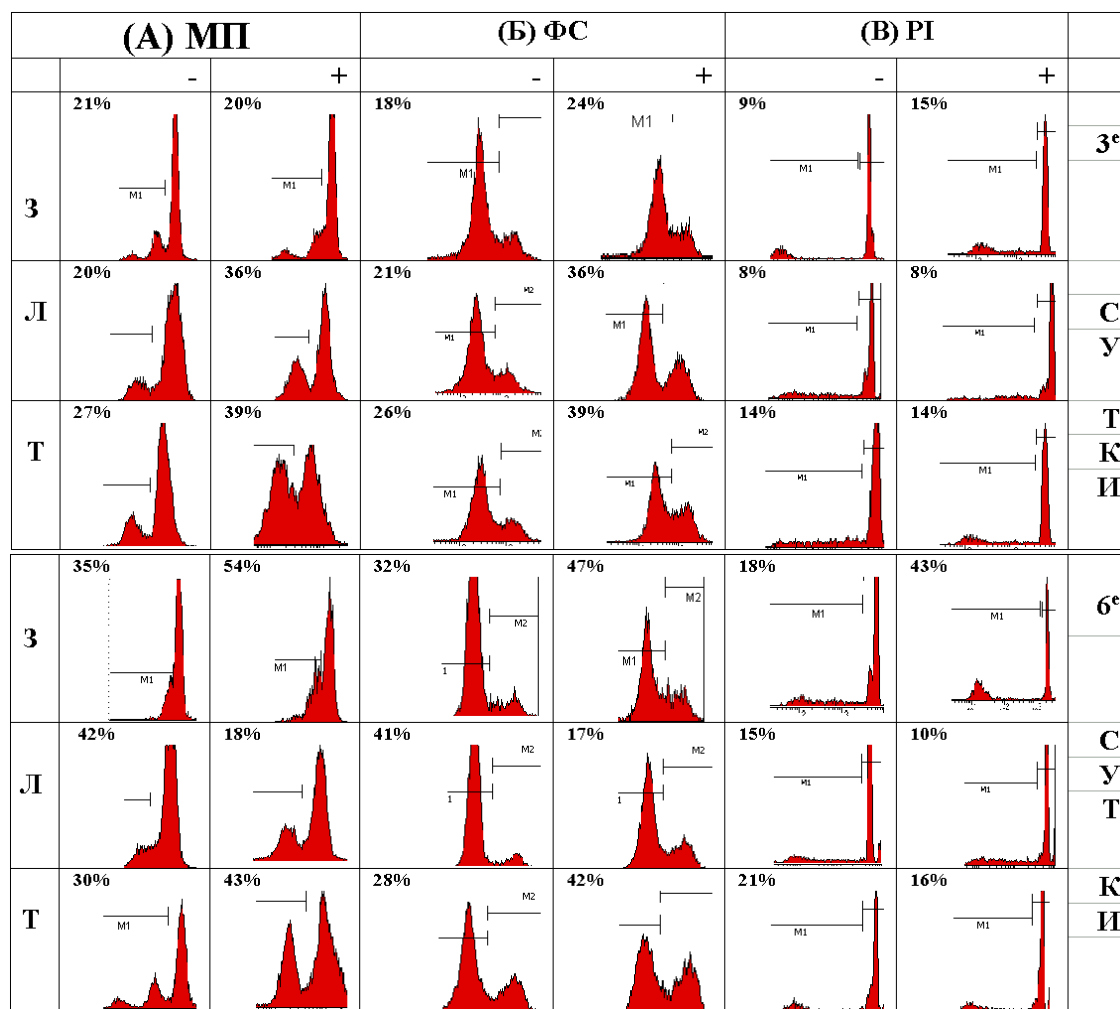


Рисунок 2. Цитофлуорограмма величины митохондриального потенциала (МП) и фосфатидилсерина (ФС) на лимфоцитах доноров (З) и больных с легким (Л) и тяжелым (Т) течением АБА отражающих ранние признаки апоптоза. Культивирование в среде с (+) и без (-) дексаметазона.

Показано, что снижение величины митохондриального потенциала (МП) лимфоцитов и экспрессия молекул фосфатидилсерина (ФС) на поверхности происходила в одно и то же время. Заметно, что на шестые сутки культивирования количество таких клеток заметно возрастает. Инкубация лимфоцитов с дексаметазоном индуцировала в них вышеперечисленные изменения. Однако динамика их существенно изменялась (рис. 2, А и Б).

Таким образом, лимфоциты больных с АБА устойчивы к ПКГ, о чем говорят результаты (рис. 2), в том числе, после обработки клеток пропидием иодидом (PI).

Устойчивость Лф больных АБА к ПКГ проявляется в замедлении фрагментации ДНК и появлением высокомолекулярных фрагментов на легкой и тяжелой стадиях тяжести АБА (рис. 3).

В норме на стадии конденсации хроматина и инвагинации ядерной мембраны апоптотических клеток происходит деградация ДНК с образованием фрагментов до 30 т. п. о., затем наступает этап межнуклеосомной фрагментации ДНК (кратная 200 п.о.).

Как следует из электрофореграммы рисунка 3, обнаружены отличия во фрагментации ДНК, выделенной из клеток условно здоровых лиц и больных АБА. Основная масса ДНК лимфоцитов условно здоровых доноров до культивирования и на третьи сутки

(рис. 3, а) представлена фрагментами в области 23 т.п.о. На шестые сутки выявляются более короткие фрагменты.

Электрофоретическое изучение выявило различия и во фрагментации молекул ДНК, выделенных из Лф больных с легкой и тяжелой формами АБА (рис. 3, б и в). ДНК лимфоцитов больных АБА до культивирования представлена не только более высокомолекулярными фрагментами около 50 т.п.о. и выше, но и короткими – до 4 т.п.о. На третьи сутки ДНК лимфоцитов представлена более короткими фрагментами. Изменяется чувствительность ДНК лимфоцитов к дексаметазону на легкой и тяжелой стадиях заболевания (рис. 3, б и рис. 3, в).

Таким образом, устойчивость Лф больных АБА к ПКГ проявляется в замедлении фрагментации ДНК и появлением высокомолекулярных фрагментов на легкой и тяжелой стадиях тяжести АБА.

Ранее [5] в гранулах лимфоцитов условно здоровых доноров, и пациентов с АБА нами была обнаружена ДНКазы, которая различается по степени активности как в норме и при патологии, так и при персистенции астмы. Индивидуальные показатели этой активности различались разбросом, вероятно, отражая иммунный статус заболевания каждого пациента (рис.4). Обнаруженная грануло-ассоциированная ДНКазная активность

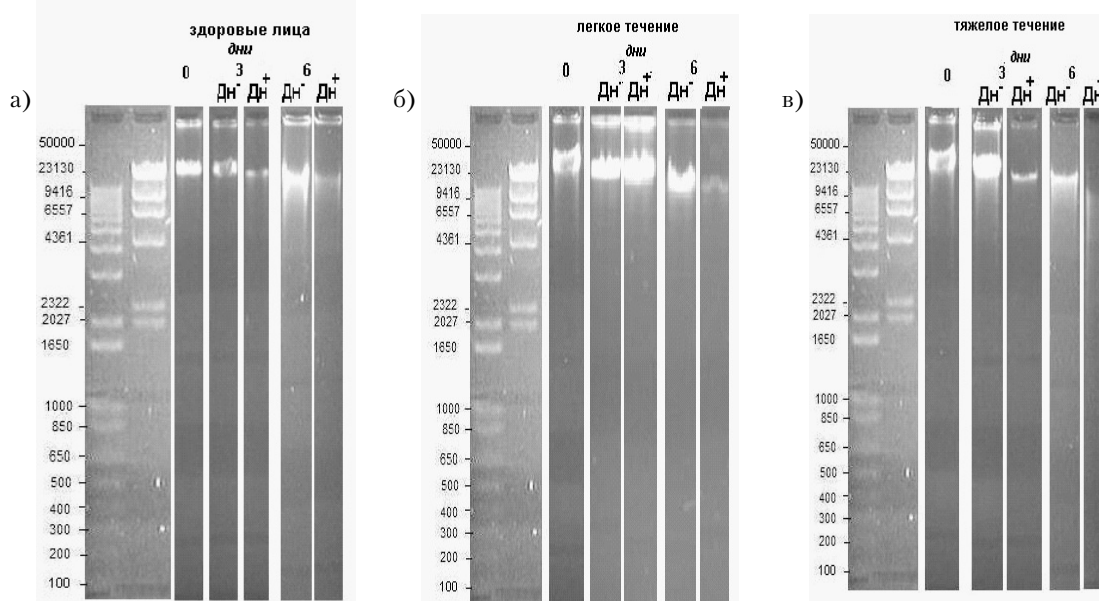


Рисунок 3. Структура ДНК из лимфоцитов здоровых лиц (а) и лиц больных АБА (б, в) до и после 3 и 6 дней культивирования, с и без индуктора апоптоза – дексаметазона (1% агарозный гель, 3,5 ч)