

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА *BCL1* ГЕНА *NR3C1* С НАРУШЕНИЕМ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Богомазова А. А.¹,
Решетникова И. Д.^{1,2},
Скибо Ю. В.¹
Абрамова З. И.¹

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУВО «Казанский Федеральный Университет»

² ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

**ASSOCIATION OF BCL1 POLYMORPHISM OF THE NR3C1 GENE WITH
IMPAIRED PROGRAMMED CELL DEATH OF LYMPHOCYTES IN
PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA**

Bogomazova A. A.^a,
Reshetnikova I. D.^{a,b},
Skibo Y. V.^a,
Abramova Z. I.^a

^a Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

^b Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Резюме.

Атопическая бронхиальная астма — это хроническое заболевание, характеризующееся обструкцией дыхательных путей, бронхиальной гиперреактивностью и воспалением. У пациентов наблюдается повышенная активация иммунных клеток в дыхательных путях, в особенности Т-лимфоцитов, что приводит к хроническому воспалению. Известно, что лимфоциты больных астмой имеют нарушенный ответ на программируемую клеточную гибель 1 и 2 типа – апоптоз и аутофагию, что способствует пролонгации и усилению воспалительного процесса. В сравнении с апоптозом, аутофагия также может способствовать выживанию клетки в условиях стресса, а её нарушение и гиперактивация приводит к отягощению аллергических реакций. Основными препаратами для лечения атопической бронхиальной астмы являются глюкокортикоиды, которые активируют глюкокортикоидный рецептор, запускающий в клетке противовоспалительный ответ и, в частности, апоптоз. Однако у некоторых пациентов наблюдается устойчивость к терапии из-за различных факторов, включающих однонуклеотидные полиморфизмы гена глюкокортикоидного рецептора *NR3C1*. Наибольшая связь тяжести астмы с устойчивостью к терапии была выявлена у GG-варианта полиморфизма *BclI*. Общие молекулярные пути активации глюкокортикоидного рецептора и программируемой клеточной гибели и опосредующие молекулярные компоненты позволяют предположить значимость роли полиморфного рецептора в уходе клеток от гибели. Целью нашего исследования являлась оценка влияния G-аллели в однонуклеотидном полиморфизме *BclI* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*, *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжёлой формой атопической бронхиальной астмы. Материалом исследования служили образцы периферической крови 24 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет с установленным диагнозом атопической бронхиальной астмой средней и тяжелой степени. Методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов пациенты были распределены по генотипам полиморфизма *BclI* гена *NR3C1*: 12 человек CC генотип, 8 человек GC, 4 человека GG генотип. Лимфоцитарную фракцию выделяли на градиенте плотности фиколла и культивировали с дексаметазоном в условиях истощения питательных веществ. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в реальном времени. При исследовании влияния различных генотипов *BclI* полиморфизма на экспрессию генов-маркеров клеточной гибели, в лимфоцитах пациентов с GG полиморфизмом под воздействием дексаметазона были выявлены антиапоптотические реакции, что может являться одним из механизмов развития резистентности к терапии глюкокортикоидными препаратами при астме. Нарушение активации экспрессии гена *BECN1* у больных с GG генотипом может предполагать дерегуляцию процесса

аутофагии у этой группы пациентов, как способа программируемой клеточной гибели. Несмотря на это, у больных с GC генотипом при длительном культивировании воздействие дексаметазона повышает экспрессию гена *LC3*, указывающую на более выраженную активацию аутофагии. Таким образом, данная работа демонстрирует различия в ответе лимфоцитов на терапию синтетическими глюкокортикоидами, а также раскрывает влияние G-аллели в генотипе *Bcl1* полиморфизма на нарушение регуляции программируемой клеточной гибели под воздействием дексаметазона.

Ключевые слова: астма; лимфоциты; глюкокортикоидный рецептор; резистентность; полиморфизм; апоптоз; аутофагия.

Abstract.

Atopic asthma is a chronic disease characterized by airway obstruction, bronchial hyperresponsiveness, and inflammation. Patients show increased activation of immune cells in the airways, especially T-lymphocytes, leading to chronic inflammation. It is known that lymphocytes of asthma patients have an impaired response to programmed cell death of types 1 and 2 - apoptosis and autophagy, which contributes to the prolongation and intensification of the inflammatory process. Compared to apoptosis, autophagy can also contribute to cell survival under stress, and its disruption and hyperactivation lead to an aggravation of allergic reactions. The main drugs for the treatment of atopic bronchial asthma are glucocorticoids, which activate the glucocorticoid receptor, which triggers an anti-inflammatory response in the cell and apoptosis. However, some patients experience resistance to therapy due to various factors, including single nucleotide polymorphisms of the *NR3C1* glucocorticoid receptor gene. The greatest association between asthma severity and resistance to therapy was found in the GG variant of the *BclI* polymorphism. Common molecular pathways for glucocorticoid receptor activation and programmed cell death and mediating molecular components suggest a significant role for the polymorphic receptor in cell death. The aim of our study was to evaluate the effect of the G allele in the *BclI* single nucleotide polymorphism of the *NR3C1* gene of the glucocorticoid receptor on the expression of genes that regulate apoptosis (*BCL2*, *CASP3*) and autophagy (*BECN1*, *LC3*) in lymphocytes of patients with moderate and severe atopic bronchial asthma. The material of the study was peripheral blood samples of 24 patients aged 20 to 45 years with an established diagnosis of moderate to severe atopic bronchial asthma. By the method of restriction fragment length polymorphism, patients were distributed according to the genotypes of the *BclI* polymorphism of the *NR3C1* gene: 12 people with the CC genotype, 8 people with the GC genotype, and 4 people with the GG genotype. The lymphocyte fraction was isolated on a ficoll density gradient and cultivated with dexamethasone under nutrient depletion conditions. The level of gene expression was determined by real-time PCR. When studying the effect of various genotypes of *BclI* polymorphism on the expression of cell death marker genes, anti-apoptotic reactions were detected in lymphocytes of patients with GG polymorphism under the influence of dexamethasone, which may be one of the mechanisms for the resistance development to glucocorticosteroid therapy in asthma. Impaired activation of *BECN1* gene expression in patients with the GG genotype may suggest deregulation of the autophagy process in this group of patients as a means of programmed cell death. Despite this, in patients with the GC genotype during long-term cultivation, exposure to dexamethasone increases the expression of the *LC3* gene, indicating a more pronounced activation of autophagy. Thus, this work demonstrates differences in the response of lymphocytes to synthetic glucocorticoid therapy and reveals the effect of the G-allele in the *BclI* polymorphism genotype on the dysregulation of programmed cell death under the influence of dexamethasone.

Keywords: asthma; lymphocyte; glucocorticoid receptor; resistance; polymorphism; apoptosis; autophagy.

1 Введение

2 Астма является серьезным неинфекционным заболеванием, от которого
3 страдают более 300 млн человек по всему миру и которое является наиболее
4 распространенным хроническим заболеванием среди детей [4]. Это
5 заболевание связано с активацией иммунной системы, гиперреактивностью и
6 ремоделированием дыхательных путей, гиперпродукцией слизи и развитием
7 хронического воспаления. При этом, наиболее распространённым типом
8 астмы является аллергическая (атопическая) астма (АБА), которая обычно
9 индуцируется сенсibilизацией к аллергенам окружающей среды [5].
10 Аллергическая астма возникает в результате сложного взаимодействия
11 стромальных клеток легкого с клетками врожденного и адаптивного
12 иммунитета. Врожденный иммунитет преимущественно способствует
13 возникновению аллергической реакции, в то время как лимфоидные клетки
14 адаптивного иммунного ответа, в частности Т-лимфоциты, связаны с
15 пролонгацией хронического воспаления [7]. Помимо стимуляции синтеза IgE
16 В-клетками и вовлечения в воспалительный процесс различных групп
17 лейкоцитов через секрецию цитокинов, Т-лимфоциты могут усиливать рост,
18 активацию и выживание клеток, участвующих в воспалительной реакции, т. е.
19 оказывают провоспалительный эффект [17].

20 Ранние исследования показали, что лимфоциты больных бронхиальной
21 астмой имеют нарушенный ответ на индукцию программируемой клеточной
22 гибели (ПКГ), что является одной из причин более стойкого и
23 пролонгированного течения воспалительного процесса [5]. В основном это
24 заболевание связывают с нарушениями ПКГ 1 и 2 типа, такими как апоптоз и
25 аутофагия. В сравнении с апоптозом, смысл аутофагии не столь однозначен,
26 так как она также может способствовать выживанию клеток в условиях
27 стресса [19]. Ингибирование апоптоза и активация аутофагии коррелирует с
28 развитием бронхиальной астмы, более тяжёлым её течением и
29 резистентностью к терапии. Среди маркеров ранних этапов аутофагии, ПКГ 2

30 типа, выделяют белок Beclin1, продукт гена *BECN1*. Взаимодействие Bcl-2 с
31 Beclin1 снижается при голодании, высвобождая последний для активации
32 аутофагии. Поэтому было высказано предположение, что Bcl-2 является не
33 только антиапоптотическим, но и антиаутофагическим белком. Beclin1
34 направляет ключевые аутофагические белки в пре-аутофагосомную
35 структуру, тем самым формируя коровый комплекс аутофагосомы [14].
36 Основным маркером заключительных этапов аутофагии является белок LC3.
37 Его липидированная форма, LC3-II, локализуется как на внешней, так и на
38 внутренней стороне мембраны аутофагосомы [3].

39 Наибольшую ассоциацию с патогенезом АБА имеет Bcl-2/Bax-
40 опосредованный путь апоптоза, связанный с семейством генов Bcl-2. Белок
41 Bcl-2, кодируемый геном *BCL2*, подавляет апоптоз посредством
42 предотвращения активации каспаз, осуществляющих этот процесс. Внешние
43 факторы и внутреннее повреждение клетки подавляет Bcl-2, что, вследствие
44 каскада сигнального пути, приводит к активации каспазы-3, продукт гена
45 *CASP3*, являющийся одним из основных маркеров апоптоза [11]. Многие
46 исследования показывают, что Bcl-2 также обнаруживается в большем
47 количестве в лимфоцитах больных астмой, по сравнению со здоровыми
48 субъектами, при этом процент лимфоцитов с повышенной экспрессией Bcl-2
49 зависит от тяжести астмы [5, 9].

50 Хроническое воспаление является сопровождающим процессом при многих
51 заболеваниях, в том числе при бронхиальной астме, и почти всегда требует
52 включения терапии синтетическими глюкокортикоидами (ГК). Их эффект
53 проявляется в связывании с глюкокортикоидным рецептором (ГР), который в
54 норме регулирует экспрессию генов и подавляет воспалительный процесс [10].
55 Однако важным фактором, определяющим низкую эффективность системной
56 терапии бронхиальной астмы, является резистентность глюкокортикоидного
57 рецептора. К ведущим причинам нечувствительности относят генетические
58 полиморфизмы гена *NR3C1*, которые могут приводить к экспрессии его

59 неактивной изоформы, изменению структуры доменов рецептора, его
60 способности связываться с лигандом и молекулярными компонентами
61 сигнальных путей [13]. Наибольшая ассоциация с тяжестью течения
62 бронхиальной астмы и более частым возникновением устойчивости к терапии
63 была выявлена у GG-варианта полиморфизма *BclI* [18, 20, 16]. Среди
64 эффектов, вызываемых активированным глюкокортикоидным рецептором в
65 лимфоцитах, наиболее значимым является регуляция ПКГ, что определяет
66 важность ее изучения у пациентов с полиморфизмом, ассоциированным с
67 резистентностью.

68 Более четкое понимание роли полиморфизмов ГР в запускаемых им
69 молекулярных процессах и влияние измененного рецептора на
70 программируемую клеточную гибель может помочь оптимизировать схемы
71 лечения пациентов с АБА, устойчивых к терапии ГК, а также стать ближе к
72 раскрытию механизмов резистентности при многих заболеваниях,
73 ассоциированных с хроническим воспалением. В связи с этим целью данного
74 исследования являлась оценка влияния G-аллели в однонуклеотидном
75 полиморфизме *BclI* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на
76 экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*,
77 *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжёлой формой атопической
78 бронхиальной астмы.

79

80 Материалы и методы

81 Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА
82 2000 года и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и
83 биомедицине 1999 года. Образцы периферической крови были получены у
84 пациентов, состоящих на учете в специализированной консультативно-
85 диагностической поликлинике инфекционно-аллергических заболеваний
86 ФБУН Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и

87 микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань (договор о научно-
88 исследовательской работе No5299091012).

89 **Объекты исследования**

90 У 24 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет установлен диагноз АБА средней и
91 тяжелой степени. Диагноз и степень тяжести АБА верифицировали согласно
92 критериям «Глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения
93 астмы» (GINA, 2023) и Федеральным клиническим рекомендациям по
94 диагностике и лечению бронхиальной астмы (Российское респираторное
95 общество, 2021). Критериями включения в исследование являлись отсутствие
96 базисной терапии АБА в течение последних 2 недель, информированное
97 согласие на обследование. К критериям исключения относили наличие
98 сопутствующей патологии со стороны других органов и систем, курение.

99 Всем больным проводилось общеклиническое обследование, включавшее
100 общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, общий анализ
101 мокроты, рентгенографию органов грудной клетки, электрокардиографию,
102 исследование функции внешнего дыхания методом спирометрии (аппарат АД
103 ОЗ-М, г. Казань). Программа аллергологического обследования включала
104 анализ аллергологического анамнеза, кожное тестирование с набором
105 стандартных диагностических аллергенов, определение уровня общего и
106 специфических IgE в сыворотке крови методом твердофазного ИФА. Забор
107 крови осуществлялся путем венепункции кубитальной вены в объеме 9 мл в
108 утренние часы до приема пищи. Периферическую кровь из локтевой вены
109 отбирали в вакуумную пробирку, содержащую ЭДТА и использовали для
110 исследований в течение 3 часов.

111 **Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов**

112 Проводили выделение ДНК из цельной крови с помощью набора ExtractDNA
113 Blood & Cells (Евроген, Россия). Методом ПЦР проводили амплификацию
114 rs41423247 (*Bcl1*) фрагмента гена *NR3C1* человека. Для проведения реакции

115 использовали праймеры со следующей нуклеотидной последовательностью:

116 Forward primer 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC -3'

117 Reverse primer 5'-AGAGCCСТАТТСТТCAAАСТG-3'

118 Смесь на 1 реакцию содержала 0,8 мкл MgCl₂, 2,5 мкл 10x буфера, 0,1 мкл
119 термостабильной Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси нуклеотидов, 0,625 мкл
120 прямого и 0,625 мкл обратного олигонуклеотидного праймера, конечная
121 концентрация ДНК в смеси составляла 10 нг/мкл. Реакция амплификации
122 состояла из начальной стадии денатурации при 94 °С (3 минуты); 30 циклов
123 денатурации при 94°С (45 секунд), отжига праймеров при 60 °С (45 секунд),
124 полимеризации при 72°С (1 минута); заключительного этапа элонгации при
125 72°С (10 минут). Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили рестриктазой Ksp22
126 I (SibEnzyme, Россия), стоковая концентрация 20000 ед/мл. Реакционная смесь
127 содержала 9,8 мкл H₂O, 2 мкл SE буфера, 0,2 мкл бычьего сывороточного
128 альбумина, 0,5 мкл рестриктазы, 7,5 мкл ПЦР-продукта. Рестрикцию
129 проводили в термоциклере в течение 1 часа при +37°С. Визуализацию
130 продуктов рестрикции проводили с помощью горизонтального гель-
131 электрофореза в 2% агарозном геле, сигнал окрашивания бромистым этидием
132 регистрировали с помощью УФ-трансиллюминатора гельдокументирующей
133 системы ChemiDoc™ (Bio-Rad, Сингапур).

134 **Культивирование клеток**

135 РВМС выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколла (ρ
136 = 1,077, ПанЭко, Россия). Для отделения моноцитов проводили
137 культивирование на адгезивном пластике в течение 2-х часов, после чего
138 отбирали суспензионную культуру с фракцией лимфоцитов. Культивировали
139 в течение 0 суток (2 часа) и 6 суток в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия),
140 содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%, ПанЭко, Россия),
141 пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл/5000 мкг/мл, ПанЭко, Россия) и L-
142 глутамин (1%, ПанЭко, Россия) в расчете 2×10^6 кл./мл в условиях истощения
143 питательных веществ. В качестве исследуемого вещества использовали
144 **Medical Immunology (Russia)**

144 дексаметазон (10^{-2} М, Sigma-Aldrich, США; конечная концентрация 10^{-4}
145 М).

146 **Определение уровня экспрессии генов-регуляторов ПКГ**

147 После культивирования отбирали клеточную суспензию, гомогенизировали
148 клеточный осадок в ExtractRNA (Евроген, Россия) (1 мл/ 10 млн клеток),
149 выделение РНК проводили по стандартному протоколу. Концентрацию и
150 степень чистоты РНК определяли с помощью NanoDropLite (Thermo Fisher,
151 США), образцы использовали при соотношении 260/280 нм \sim 2,0, 260/230 в
152 диапазоне 2,0–2,2. Проводили синтез кДНК на матрице РНК с помощью
153 набора РЕВЕРТА-L (ИнтерЛабСервис, Россия). С помощью метода ПЦР в
154 реальном времени определяли уровень экспрессии генов-регуляторов
155 апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и генов-регуляторов аутофагии (*LC3*, *BECN1*),
156 визуализировали с помощью красителя FAM. В качестве гена домашнего
157 хозяйства для референсного значения использовали ген *ACTB* (краситель
158 VIC). Праймеры для гена *ACTB*: Прямой – 5’-
159 CACCATTGGCAATGAGCGGTTC -3’; Обратный – 5’-
160 AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT -3’. *BCL2*: Прямой – 5’-
161 GTGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3’; Обратный – 5’-
162 CACCTACCCAGCCTCCGTTA-3’. *BECN1*: Прямой – 5’-
163 CAGGAACTCACAGCTCCATTAC-3’; Обратный –
164 CCATCCTGGCGAGTTTCAATA-3’. *CASP3*: Прямой – 5’-
165 TGGCCCTGAAATACGAAGTC-3; Обратный – 5’-
166 GGCAGTAGTCGACTCTGAAG-3. *LC3*: Прямой – 5’-
167 CTGGACTTCTTAGAGTTCGTT-3’; Обратный – 5’-
168 CACСТААТCGCCTCCGТАА-3’.

169 Для основы реакции использовали TaqMan™ Universal PCR Master Mix
170 (ThermoFisher, США), содержащий Taq-полимеразу AmpliTaq Gold™ DNA
171 Polymerase, урацил-ДНК-гликозилазу, dNTP с dUTP, эталонный краситель
172 ROX, буферные компоненты. На 1 пробу 5 мкл 2x Master Mix, Праймеры FaM-
Medical Immunology (Russia)

173 20x 0,5 мкл, Праймеры ViC-20x 0,5 мкл, dH₂O 2,0 мкл. Амплифицировали с
174 помощью CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) при:
175 1 цикл при 95°C (5 минут); 40 циклов при 95°C (30 секунд), при 60°C (30
176 секунд), при 72°C (15 секунд). Для оценки уровня экспрессии генов и
177 нормализации использовали дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta C_t$) метод.

178 **Статистическая обработка результатов**

179 Для математического анализа и визуализации полученных результатов
180 использовали пакет программ «GraphPad Prism 8.4.3.686» и «PAST v3.17». Для
181 проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий
182 Шапиро-Уилка. Для анализа выборки, не поддающейся закону нормального
183 распределения, использовали структурные характеристики (медиану,
184 перцентили 2,5 и 97,5). Для оценки различий между отдельными выборками
185 применяли непараметрические критерии Крускала-Уоллиса (для общей
186 характеристики выборки), а после проводили множественные апостериорные
187 сравнения с помощью теста Данна (Dunn's post hoc test). Статистически
188 значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

189

190 **Результаты**

191 **Определение вариантов *Bcl1* полиморфизма в группе пациентов с АБА**

192 В ходе метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и гель-
193 электрофореза определили варианты полиморфизма *Bcl1* у пациентов из
194 исследуемой группы. Репрезентативная визуализация генотипов GG, CC и GC
195 представлена на рисунке 1.

196 Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК после
197 рестрикции ПЦР-продуктов образцов больных астмой с различными
198 генотипами полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*.

199 **Сравнение экспрессии генов программируемой клеточной гибели**

200 Мы оценили изменения экспрессии генов в лимфоцитах больных атопической
201 бронхиальной астмы при различной длительности культивирования с

202 добавлением и без добавления дексаметазона в зависимости от генотипа
203 полиморфизма *Bcl1*. На рисунке 2 представлены относительные уровни
204 экспрессии генов-регуляторов ПКГ.

205 Рисунок 2 – Уровни относительной экспрессии генов-маркеров
206 программируемой клеточной гибели в лимфоцитах больных атопической
207 бронхиальной астмой с CC, GC и GG генотипами *Bcl1* полиморфизма гена
208 *NR3C1*

209 По результатам исследования, у больных АБА с CC и GC вариантами *Bcl1*
210 полиморфизма уровень экспрессии гена *BECN1*, кодирующего белок-
211 индуктор аутофагии, статистически значимо повышается под воздействием
212 дексаметазона как при кратковременном, так и при длительном
213 культивировании. Также было отмечено, что в группе с GG вариантом
214 полиморфизма экспрессия *BECN1* не изменялась. В ходе исследования было
215 отмечено значительное повышение уровня экспрессии гена *LC3*, маркера
216 заключительного этапа аутофагии, через 2 часа культивирования с
217 дексаметазоном по сравнению с контролем в группах с CC и GC вариантами
218 полиморфизма. При длительном культивировании воздействие дексаметазона
219 статистически значимо повышало экспрессию *LC3* во всех группах больных
220 АБА. При этом уровень экспрессии *LC3* был значительно выше в группе с GC
221 генотипом.

222 При 2-часовом воздействии дексаметазона статистически значимое
223 повышение уровня экспрессии гена *BCL2* наблюдалось только в группе
224 больных АБА с GG вариантом *Bcl1* полиморфизма. При длительном
225 культивировании с воздействием дексаметазона в лимфоцитах всех групп
226 пациентов наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *BCL2*. Как при
227 кратковременном, так и 6-дневном культивировании с дексаметазоном, в
228 лимфоцитах группы больных с CC и GC вариантами полиморфизма
229 происходит статистически значимое повышение уровня экспрессии гена
230 *CASP3*, по сравнению с необработанным лекарством клетками. Активация

231 апоптоза в клетках является нормальным эффектом глюкокортикоидного
232 рецептора, однако в группе с GC полиморфизмом (содержащей G аллель,
233 ассоциированную с более тяжёлым течением АБА), уровень экспрессии
234 *CASP3* меньше, чем в группе с CC вариантом, ассоциированным с нормальным
235 ответом на ГК. Что примечательно, в лимфоцитах группы с GG вариантом
236 полиморфизма, уровень экспрессии *CASP3* остаётся на прежнем уровне вне
237 зависимости от времени воздействия дексаметазона на клетки.

238

239 Обсуждение

240 Ранее мы упоминали значение нарушения регуляции ПКГ в патогенезе и
241 повышенной стойкости течения АБА, а также изменения ответа на
242 глюкокортикоиды у пациентов с различными вариантами *Bcl1* полиморфизма
243 гена *NR3C1*. Развитие хронического воспаления при атопической
244 бронхиальной астме в первую очередь зависит от продолжительности
245 рекрутирования клеток из кровеносного русла в слизистую оболочку бронхов
246 и их поверхностной активации, поэтому пролонгация аллергического
247 воспаления при АБА может быть связано с усилением выживаемости Т-
248 лимфоцитов и утратой их способности к ПКГ. Ранними исследованиями было
249 показано, что лимфоциты пациентов с АБА имеют нарушенный ответ на
250 индукцию апоптоза и это является одной из причин длительного воспаления
251 дыхательных путей [5]. Исследования последних лет продемонстрировали,
252 что одним из ключевых механизмов ухода клеток от апоптоза является
253 аутофагия, представляющая собой важную терапевтическую мишень для
254 устранения основных астматических симптомов и обхода проблемы
255 резистентности [23]. При этом нарушение или чрезмерная активация
256 аутофагии во время хронической фазы аллергической реакции может
257 усиливать накопление аутофагосом и активировать проникающие в легкие
258 клетки врожденного иммунитета, а также эпителиальные клетки дыхательных
259 путей, что приводит к снижению функции легких.

260 Продукт гена *BECN1* участвует в реакциях, определяющих баланс между
261 апоптозом и аутофагией. После диссоциации белка Bcl-2, Beclin1 переходит в
262 активную форму и образует комплекс с VPS34 и другими белками-
263 регуляторами аутофагии, в результате чего стимулируется наращивание
264 липидной мембраны аутофагосомы, изолирование груза и завершается
265 процесс нуклеации. Недостаток питательных веществ в культуральной среде
266 индуцирует аутофагию и позволяет выявить нарушение этого процесса в
267 клетках. Неизменный уровень экспрессии *BECN1* при подобных условиях в
268 группе с GG вариантом полиморфизма может предполагать наличие у этой
269 группы больных нарушения активации аутофагии, как способа
270 программируемой клеточной гибели. Увеличение экспрессии гена LC3 может
271 указывать на повышенную активацию аутофагии и образование аутофагосом.
272 Аллель G ассоциирована с более тяжёлым течением бронхиальной астмы,
273 однако GC вариант полиморфизма характеризуется резистентностью к
274 терапии реже, чем GG вариант [20]. Повышение уровня аутофагии
275 демонстрирует нормальный физиологический ответ на недостаток
276 питательных веществ, однако учитывая нарушение последних этапов
277 аутофагии у всей группы больных атопической бронхиальной астмой, процесс
278 может усиливать аллергическое воспаление и отягощать симптоматическую
279 картину [7, 23].

280 По-видимому, аутофагия играет уравнивающую роль, призванную
281 избежать чрезмерного повреждения легочной ткани, обеспечивая при этом
282 защитный ответ против патогенов, что делает её неоднозначной, но
283 неоспоримо важной мишенью при терапии.

284 Было показано, что кортикостероиды уменьшают воспаление множеством
285 способов, включая снижение продукции медиаторов воспаления и подавление
286 иммунной системы за счет снижения активности и объема лимфоцитов [1].

287 Полиморфные варианты гена *NR3C1*, а также альтернативные молекулярные
288 механизмы могут приводить к снижению экспрессии ГР- α , функциональной

289 изоформы рецептора и, наоборот, повышению экспрессии нефункциональной
290 изоформы ГР- β , неспособной связываться с гормонами и синтетическими
291 ГКС. Помимо изменения уровня экспрессии активной и неактивной
292 изоформы, генетические полиморфизмы и, как следствие, альтернативный
293 сплайсинг могут приводить к дефектному связыванию ГКС с ГР- α [22, 14].
294 Помимо генетических полиморфизмов рецептора, одной из причин
295 возникновения устойчивости, связанных с нарушением связывания ГК с ГР- α ,
296 можно считать фосфорилирование такими киназами, как MAPK и JNK, что
297 препятствует его транслокации в ядро и активации транскрипции
298 противовоспалительных генов [24]. Перечисленные механизмы имеют
299 прочную связь с регуляцией программируемой гибели в клетке, и изменение
300 структуры ГР может оказывать прямое влияние на апоптоз и аутофагию.
301 Хорошо известно, что высокие дозы глюкокортикоидов вызывают апоптоз в
302 Т-клетках, В-клетках, макрофагах, незрелых дендритных клетках,
303 эозинофилах и в натуральных киллерах. При этом существует много типов
304 клеток, которые устойчивы или антиапоптотически реагируют на
305 глюкокортикоиды, а различные трансляционные изоформы GR α индуцируют
306 апоптоз с разной скоростью. [12].

307 Белок Bcl-2 участвует в регуляции как аутофагии, так и апоптоза, и
308 поддерживает аутофагию в клетке на физиологическом уровне. В нормальных
309 условиях белок Bcl-2 связан с белком Beclin1, но в условиях недостатка
310 питательных веществ (и влияния других стимулов индукции аутофагии, как
311 механизма выживания), Bcl-2 диссоциирует от Beclin1, освобождая его для
312 дальнейшего каскада взаимодействий с белками аутофагии [15]. Повышение
313 уровня экспрессии Bcl-2 может быть связано как с ингибированием аутофагии
314 с целью удержания её в физиологических пределах, так и с ингибированием
315 апоптоза в ответ на сильный индуктивный проапоптотический эффект
316 дексаметазона. Ассоциация GG варианта полиморфизма с резистентностью к
317 терапии ГК может объясняться данной активацией антиапоптотических

318 механизмов даже в ответ на кратковременное воздействие лекарства. Однако
319 сильная индукция аутофагии под воздействием недостатка питательных
320 веществ в культуральной среде может активировать физиологические
321 регуляторы, такие как Bcl-2, для стабилизации ПКГ в лимфоцитах пациентов
322 со всеми вариантами полиморфизма. Несмотря на это, анализы клеток,
323 экспрессирующих различные уровни Bcl-2 и Bax, показали, что степень
324 подавления апоптоза коррелирует с количеством Bcl-2, свободного от Bax, а
325 не с общим количеством Bcl-2, что также может влиять на интерпретацию
326 полученных результатов [21]. Наиболее значимые результаты исследования
327 маркеров апоптоза были получены при оценке относительной экспрессии гена
328 *CASP3*. Каспазы являются важнейшими медиаторами апоптоза, среди которых
329 продукт гена *CASP3* является наиболее часто активируемой протеазой,
330 катализирующей специфическое расщепление многих ключевых клеточных
331 белков [8]. Отсутствие изменений уровня экспрессии *CASP3* в лимфоцитах
332 группы с GG вариантом полиморфизма демонстрирует толерантность таких
333 иммунных клеток к воздействию дексаметазона. Подобная блокировка
334 апоптотического ответа на глюкокортикоиды может служить одним из
335 механизмов резистентности клеток к терапии и объяснять структурные и
336 функциональные изменения, происходящие с полиморфным
337 глюкокортикоидным рецептором.

338 Таким образом, мы установили, что несмотря на упомянутую роль аутофагии,
339 связанную с выживанием клеток, пониженная экспрессия ее генов-
340 регуляторов у больных с GG вариантом полиморфизма *Bcl1* под воздействием
341 дексаметазона, может служить одним из механизмов ухода от клеточной
342 гибели и развития резистентности. Выявленная нами устойчивость к индукции
343 апоптоза в таких клетках лишь подтверждает, что изменения в строении
344 полиморфного глюкокортикоидного рецептора могут запускать
345 альтернативные сигнальные каскады, возможно блокирующие клеточную
346 гибель и требующие дальнейшего подробного изучения.

347

348 Благодарности

349 Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках
350 государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального
351 университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих
352 мировых научно-образовательных центров.

Примечания: уровни относительной экспрессии генов *BECN1* (А), *LC3* (Б), *BCL2* (В), *CASP3* (Г) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) в лимфоцитах в присутствии и отсутствии в питательной среде дексаметазона (+DEX/- DEX) ($10^{-4}M$) на 0 сутки (0 с) и на 6 сутки (6 с) культивирования. Статистически значимые различия при $p < 0,05$ внутри одной группы между образцами +DEX и -DEX обозначены *, дополнительные статистически значимые различия обозначены * с рамкой.

Notes: relative expression of *BECN1* (A), *LC3* (B), *BCL2* (C), *CASP3* (D) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) genes in lymphocytes in the presence and absence of dexamethasone (+DEX/- DEX) in nutrient medium ($10^{-4}M$) on day 0 (0 c) and on day 6 (6 c) of cultivation. Statistically significant differences at $p < 0.05$ within the same group between +DEX and -DEX samples are indicated by *, additional statistically significant differences are indicated by * with a box.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК после рестрикции ПЦР-продуктов образцов больных астмой с различными генотипами полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*.

Примечание: 1 - GG генотип, 1 фрагмент длиной 418 п.н.; 2 – GC генотип из 3-х фрагментов длиной 418 п.н., 267 п.н. и 151 п.н.; 3 – CC полиморфизм из 2-х фрагментов длиной 267 п.н. и 151 п.н.; 4 – ПЦР-продукт, не подвергавшийся воздействию рестриктазы (К -Р); М – DNA HyLadder; п.н., пар нуклеотидов.

Figure 1. Electrophoresis separation of *Bcl1* polymorphism digestion products of *NR3C1* gene from samples of atopic bronchial asthma patients with different genotypes

Note: 1 - 418-bp band for GG; 2 - three bands, 418-, 267- and 151-bp for GC; 3 – two bands, 267- and 151-bp, for CC are shown; PCR-product without restriction (К -Р); М – DNA HyLadder; bp, base pair.

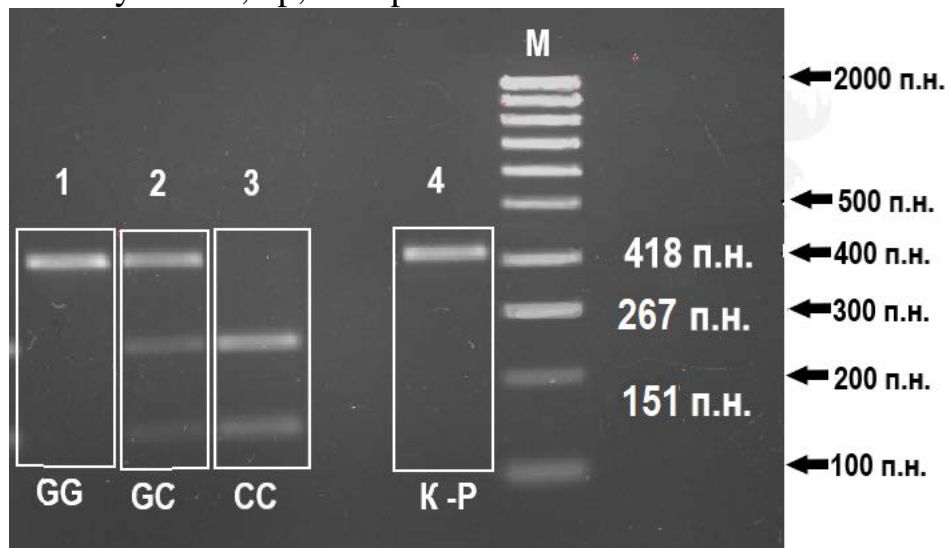
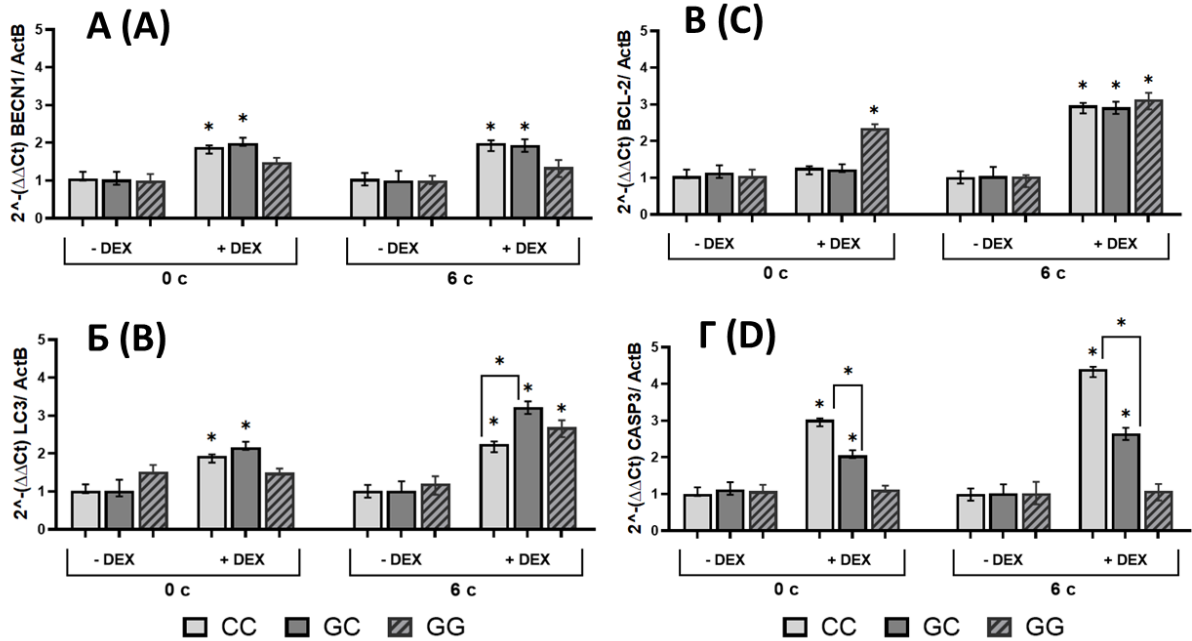


Рисунок 2. Уровни относительной экспрессии генов-маркеров программируемой клеточной гибели в лимфоцитах больных атопической бронхиальной астмой с CC, GC и GG генотипами *BclII* полиморфизма гена *NR3C1*.

Figure 2. Relative expression of genes-markers of programmed cell death in lymphocytes of patients with atopic bronchial asthma with CC, GC and GG *BclII* polymorphisms of *NR3C1* gene.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Богомазова Арина Алексеевна – магистр кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, лаборант-исследователь; НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

индекс: 420008;

телефон: 89393960098;

e-mail: bogomazova.arina.01@mail.ru

Bogomazova Arina Alekseevna – master student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, research laboratory assistant; Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University;

index: 420008;

telephone: 89393960098;

e-mail: bogomazova.arina.01@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Решетникова Ирина Дмитриевна – к.м.н., доцент, заместитель директора по научной работе Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии;

Reshetnikova Irina Dmitrievna – Candidate of Sciences in Medicine, associate professor, deputy director for scientific work of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

Скибо Юлия Валерьевна – к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

Yulia Valerievna Skibo – Candidate of Sciences in Biology, senior researcher at the Research Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University.

Абрамова Зинаида Ивановна – д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, главный научный сотрудник НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Abramova Zinaida Ivanovna – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Chief Researcher of the Research Laboratory “Immunopathology”, Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Kazan (Volga Region) Federal University”.

Блок 3. Метаданные статьи

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА *BCL1* ГЕНА *NR3C1* С НАРУШЕНИЕМ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ
NAZVANIE STAT' I

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

BCL1 И ГИБЕЛЬ ЛИМФОЦИТОВ
BCL1 AND LYMPHOCYTE DEATH

Ключевые слова: астма; лимфоциты; глюкокортикоидный рецептор; резистентность; полиморфизм; апоптоз; аутофагия.

Keywords: asthma; lymphocyte; glucocorticoid receptor; resistance; polymorphism; apoptosis; autophagy.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 8, количество таблиц – 0, количество рисунков – 2.

30.08.2023

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Abaya R., Jones L., Zorc J.J. Dexamethasone Compared to Prednisone for the Treatment of Children With Acute Asthma Exacerbations. <i>Pediatric Emergency Care</i> , 2018, Vol. 34, no. 1, pp. 53–58.	-	[DOI: 10.1097/PEC.000000000000371]
2	Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. <i>BMC immunology</i> , 2008, Vol. 9, pp. 73.	-	[DOI: 10.1186/1471-2172-9-73]
3	Abramov S. N., Skibo Y.V., Evtugyn V.G., Vodounon C.A., Abramova Z.I. The Role of T-Lymphocytes Autophagy in Severe Atopic Asthma Pathogenesis. <i>BioNanoScience</i> , 2017, Vol. 7, pp. 269–271.	-	[DOI: 10.1007/s12668-016-0337-3]
4	Ali F.R. Does this patient have atopic asthma? <i>Clinical Medicine</i> , 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 376–380.	-	[DOI: 10.7861/clinmedicine.11-4-376]
5	Boonpiyathad T., Sözener Z.C., Satitsuksanoa P., Akdis C.A. Immunologic mechanisms in asthma. <i>Seminars in Immunology</i> , 2019, Vol. 46, pp. 101333	-	[DOI: 10.1016/j.smim.2019.101333]
6	Goleva E., Li L.–B., Eves P.T., Strand M.J., Martin R.J., Leung D.Y.M. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid	-	[DOI: 10.1164/rccm.200507-1046OC]

	response in glucocorticoid-insensitive asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2006, Vol. 173, no. 6, pp. 607–616.		
7	Gorska M.M. Natural killer cells in asthma. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2017, Vol. 17, no. 1, pp. 50–54.	-	[DOI: 10.1097/ACI.0000000000000327]
8	Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. Cells, 2013, Vol. 2, no. 2, pp. 202–223.	-	[DOI: 10.3390/cells2020202]
9	Hamzaoui A., Hamzaoui K., Salah H., Chabbou A. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma. Mediators of Inflammation, 1999, Vol. 8, no. 4–5, pp. 237–243.	-	[DOI: 10.1080/09629359990405]
10	Henderson I., Caiazza E., McSharry C., Guzik T.J., Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? Pharmacological Research, 2020, Vol. 160, pp. 105189.	-	[DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105189]
11	Holtzman M.J., Green J.M., Jayaraman S., Arch R.H. Regulation of T cell apoptosis. Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death, 2000, Vol. 5, no. 5, pp. 459–471.	-	[DOI: 10.1023/a:1009657321461]
12	Lu N.Z., Collins J.B., Grissom S.F., Cidlowski J.A. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. Molecular and Cellular Biology, 2007, Vol. 27, no. 20, pp. 7143–7160.	-	[DOI: 10.1128/MCB.00253-07]

13	Lu N.Z., Cidlowski J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i> , 2004, Vol. 1024, pp. 102–123.	-	[DOI: 10.1196/annals.1321.008]
14	Marquez R.T., Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. <i>American Journal of Cancer Research</i> , 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 214–221.	-	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3304572/
15	Mizushima N., Autophagy: process and function. <i>Genes & Development</i> , 2007, Vol. 21, no. 22, pp. 2861–2873.	-	[DOI: 10.1101/gad.1599207]
16	Mohsen H., Moustafa K., Riad N., Shaaban H., El Basha N. The effect of BclI polymorphism of NR3C1 gene on asthma phenotypes in Egyptian children. <i>The Egyptian Journal of Pediatric Allergy and Immunology</i> , 2020, Vol. 18, pp. 71–77.	-	[DOI: 10.21608/ejpa.2020.31274.1008]
17	Murdoch J.R., Lloyd C. M. Chronic inflammation and asthma. <i>Mutation Research</i> , 2010, Vol. 690, no.1–2, pp. 24–39.	-	[DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005]
18	Panek M., Pietras T., Fabijan A., Miłanowski M., Wieteska L., Górski P., Kuna P., Szemraj J. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes. <i>Experimental and Therapeutic Medicine</i> , 2013, Vol. 5, no. 2, pp. 572–580.	-	[DOI: 10.3892/etm.2012.809]
19	Parzych K.R., Klionsky D.J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. <i>Antioxidants & Redox Signaling</i> , 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 460–473.	-	[DOI: 10.1089/ars.2013.5371]
20	Pietras T., Panek M., Tworek D., Oszejka K., Wujcik R., Górski P., Kuna P., Szemraj J. The Bcl I single nucleotide polymorphism of the human glucocorticoid receptor gene h–	-	[DOI: 10.1007/s11033-010-0512-5]

	GR/NR3C1 promoter in patients with bronchial asthma: pilot study. <i>Molecular Biology Reports</i> , 2011, Vol. 3		
21	Potapinska O., Demkow U. T lymphocyte apoptosis in asthma. <i>European Journal of Medical Research</i> , 2009, Vol. 14, no. Suppl 4, pp. 192– 195.	-	[DOI: https://doi.org/10.1186/2047-783X-14-S4-192]
22	Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. Ligand–Induced Repression of the Glucocorticoid Receptor Gene Is Mediated by an NCoR1 Repression Complex Formed by Long–Range Chromatin Interactions with Intragenic Glucocorticoid Response Elements. <i>Molecular and Cellular Biology</i> , 2013, Vol. 33, no. 9, pp. 1711– 1722.	-	[DOI: 10.1128/MCB.01151-12]
23	Theofani, E. Autophagy: A Friend or Foe in Allergic Asthma? [Text] / E. Theofani, G. Xanthou // <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . – 2021. – T. 22. – Autophagy. – № 12. – P. 6314.	-	[DOI: 10.3390/ijms22126314]
24	Weigel N.L., Moore N.L. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. <i>Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)</i> , 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2311– 2319.	-	[DOI: 10.1210/me.2007-0101]