

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 ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

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-го и 2-го 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 ее нарушение и гиперактивация – приводить 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 *Bcl1*. 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 *Bcl1* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*, *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжелой формой атопической бронхиальной астмы. Материалом исследования служили образцы периферической крови 24 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет с установленным диагнозом «атопическая бронхиальная астма» средней и тяжелой степени. Методом

Адрес для переписки:

Богомазова Арина Алексеевна
Институт фундаментальной медицины и биологии
ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18, ком. 104В.
Тел.: 8 (939) 396-00-98.
E-mail: arnbgmz@yandex.ru

Address for correspondence:

Arina A. Bogomazova
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan Federal University
18 Kremlevskaya St, Room 104V
Kazan, Republic of Tatarstan
420008 Russian Federation
Phone: +7 (939) 396-00-98.
E-mail: arnbgmz@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Богомазова, И.Д. Решетникова, Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова «Ассоциация полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1* с нарушением программируемой клеточной гибели лимфоцитов больных атопической бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 523-532. doi: 10.15789/1563-0625-AON-2908

© Богомазова А.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Bogomazova, I.D. Reshetnikova, Yu.V. Skibo, Z.I. Abramova "Association of *NR3C1 Bcl1* gene polymorphism with impaired programmed cell death of lymphocytes in patients with atopic bronchial asthma", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 523-532.
doi: 10.15789/1563-0625-AON-2908

© Bogomazova A.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AON-2908

полиморфизма длин рестрикционных фрагментов пациенты были распределены по генотипам полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*: 12 человек – СС-генотип, 8 человек – GC, 4 человека – GG-генотип. Лимфоцитарную фракцию выделяли на градиенте плотности фикола и культивировали с дексаметазоном в условиях истощения питательных веществ. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в реальном времени. При исследовании влияния различных генотипов *Bcl1* 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 глюкокортикостероидами 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

ASSOCIATION OF *NR3C1 Bcl1* GENE POLYMORPHISM WITH IMPAIRED PROGRAMMED CELL DEATH OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

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

^a Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

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. The lymphocytes of asthma patients are known to have an impairment of the type 1 and 2 programmed cell death, i.e., apoptosis and autophagy, thus contributing to prolongation and intensification of inflammatory process. As compared to apoptosis, autophagy may also contribute to cell survival under stress conditions. Its disruption and hyperactivation leads to exacerbation of allergic responses. Glucocorticoids are the main drugs for the treatment of atopic bronchial asthma by activating the glucocorticoid receptor, thus triggering anti-inflammatory response and apoptosis of the cells. However, some patients exhibit resistance to therapy due to various factors, including single nucleotide polymorphisms of *NR3C1* glucocorticoid receptor gene. The highest association between asthma severity and resistance to therapy was found for the GG variant of the *NR3C1 Bcl1* polymorphism. Common molecular pathways for glucocorticoid receptor activation and programmed cell death and mediating molecules suggest a significant role for the polymorphic receptor variant in cell death. The aim of our study was to evaluate the effect of a single nucleotide polymorphism (G allele, i.e., *Bcl1* polymorphism of *NR3C1* gene) of glucocorticoid receptor on expression levels of genes that regulate apoptosis (*BCL2*, *CASP3*) and autophagy (*BECN1*, *LC3*) in lymphocytes of patients with moderate and severe atopic bronchial asthma. The study was performed with peripheral blood samples of 24 patients aged 20 to 45 years with an established diagnosis of moderate to severe atopic bronchial asthma. Using PCR technique with restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay, the patients were distributed according to the genotypes of the *Bcl1* polymorphism of the *NR3C1* gene: 12 patients with CC genotype, 8 persons with GC genotype, and 4 cases with GG genotype. The lymphocytes were isolated in Ficoll density gradient and cultivated with dexamethasone under the conditions of nutrient depletion. The level of gene expression was determined by real-time PCR. When studying associations between various genotypes of *Bcl1* polymorphism and expression of cell death marker genes, the anti-apoptotic reactions were detected in lymphocytes of patients with GG polymorphism under the influence of dexamethasone thus being a potential mechanism for development of resistance to glucocorticosteroid therapy in asthma. Impaired activation of *BECN1* gene expression in patients with the GG genotype may suggest deregulation of the autophagy in this

group of patients, as a mode of programmed cell death. Moreover, in patients with GC genotype during long-term cultivation, exposure to dexamethasone increases the expression of the *LC3* gene, indicating a more pronounced activation of autophagy. Hence, this work demonstrates differences in response of lymphocytes to synthetic glucocorticoid therapy, and probable effect of G allele (*Bcl1* polymorphism) on dysregulation of programmed cell death under the influence of dexamethasone.

Keywords: bronchial asthma, lymphocytes, glucocorticoid receptor, resistance, polymorphism, apoptosis, autophagy

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

Введение

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

Ранние исследования показали, что лимфоциты больных бронхиальной астмой имеют нарушенный ответ на индукцию программируемой клеточной гибели (ПКГ), что является одной из причин более стойкого и пролонгированного течения воспалительного процесса [5]. В основном это заболевание связывают с нарушениями ПКГ 1-го и 2-го типа, такими как апоптоз и аутофагия. В сравнении с апоптозом смысл аутофагии не столь однозначен, так как она также может способствовать выживанию клеток в условиях стресса [19]. Ингибирование апоптоза и активация ау-

тофагии коррелирует с развитием бронхиальной астмы, более тяжелым ее течением и резистентностью к терапии. Среди маркеров ранних этапов аутофагии, ПКГ 2-го типа, выделяют белок Beclin-1, продукт гена *BECN1*. Взаимодействие Bcl-2 с Beclin-1 снижается при голодании, высвобождая последний для активации аутофагии. Поэтому было высказано предположение, что Bcl-2 является не только антиапоптотическим, но и антиаутофагическим белком. Beclin-1 направляет ключевые аутофагические белки в преаутофагосомную структуру, тем самым формируя коровый комплекс аутофагосомы [14]. Основным маркером заключительных этапов аутофагии является белок LC3. Его липидированная форма, LC3-II, локализуется как на внешней, так и на внутренней стороне мембраны аутофагосомы [3].

Наибольшую ассоциацию с патогенезом АБА имеет Bcl-2/Вак-опосредованный путь апоптоза, связанный с семейством генов Bcl2. Белок Bcl-2, кодируемый геном *BCL2*, подавляет апоптоз посредством предотвращения активации каспаз, осуществляющих этот процесс. Внешние факторы и внутреннее повреждение клетки подавляет Bcl-2, что вследствие каскада сигнального пути приводит к активации каспазы-3, продукт гена *CASP3*, являющийся одним из основных маркеров апоптоза [11]. Многие исследования показывают, что Bcl-2 также обнаруживается в большем количестве в лимфоцитах больных астмой, по сравнению со здоровыми субъектами, при этом процент лимфоцитов с повышенной экспрессией Bcl-2 зависит от тяжести астмы [5, 9].

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

менов рецептора, его способности связываться с лигандом и молекулярными компонентами сигнальных путей [13]. Наибольшая ассоциация с тяжестью течения бронхиальной астмы и более частым возникновением устойчивости к терапии была выявлена у GG-варианта полиморфизма *Bcl1* [16, 18, 20]. Среди эффектов, вызываемых активированным глюкокортикоидным рецептором в лимфоцитах, наиболее значимым является регуляция ПКГ, что определяет важность ее изучения у пациентов с полиморфизмом, ассоциированным с резистентностью.

Более четкое понимание роли полиморфизмов ГР в запускаемых им молекулярных процессах и влияние измененного рецептора на программируемую клеточную гибель может помочь оптимизировать схемы лечения пациентов с АБА, устойчивых к терапии ГК, а также стать ближе к раскрытию механизмов резистентности при многих заболеваниях, ассоциированных с хроническим воспалением. В связи с этим целью данного исследования являлась оценка влияния G-аллели в однонуклеотидном полиморфизме *Bcl1* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*, *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжелой формой атипичической бронхиальной астмы.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 года и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 года. Образцы периферической крови были получены у пациентов, состоящих на учете в специализированной консультативно-диагностической поликлинике инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань (договор о научно-исследовательской работе № 5299091012).

Объекты исследования

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

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

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Проводили выделение ДНК из цельной крови с помощью набора ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия). Методом ПЦР проводили амплификацию rs41423247 (*Bcl1*) фрагмента гена *NR3C1* человека. Для проведения реакции использовали праймеры со следующей нуклеотидной последовательностью:

Forward primer 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'

Reverse primer 5'-AGAGCCCTATTCTCAAAGT-3'

Смесь на 1 реакцию содержала 0,8 мкл MgCl₂, 2,5 мкл 10× буфера, 0,1 мкл термостабильной Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси нуклеотидов, 0,625 мкл прямого и 0,625 мкл обратного олигонуклеотидного праймера, конечная концентрация ДНК в смеси составляла 10 нг/мкл. Реакция амплификации состояла из начальной стадии денатурации при 94 °С (3 минуты); 30 циклов денатурации при 94 °С (45 секунд), отжига праймеров при 60 °С (45 секунд), полимеризации при 72 °С (1 минута); заключительного этапа элонгации при 72 °С (10 минут). Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили рестриктазой Ksp22 I (SibEnzyme, Россия), стоковая концентрация 20 000 ед/мл. Реакционная смесь содержала 9,8 мкл H₂O, 2 мкл SE буфера, 0,2 мкл бычьего сывороточного альбумина, 0,5 мкл рестриктазы, 7,5 мкл ПЦР-продукта. Рестрикцию проводили в термоциклере в течение 1 часа при +37 °С. Визуализацию продуктов рестрикции проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле, сигнал окрашивания бромистым этидием регистрировали с помощью УФ-транслюминатора геледокументирующей системы ChemiDoc™ (Bio-Rad, Сингапур).

Культивирование клеток

РВМС выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фикола ($\rho = 1,077$,

НПП «ПанЭко», Россия). Для отделения моноцитов проводили культивирование на адгезивном пластике в течение 2 часов, после чего отбирали суспензионную культуру с фракцией лимфоцитов. Культивировали в течение 0 суток (2 часа) и 6 суток в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%, НПП «ПанЭко», Россия), пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл / 5000 мкг/мл, НПП «ПанЭко», Россия) и L-глутамин (1%, НПП «ПанЭко», Россия) в расчете 2×10^6 кл/мл в условиях истощения питательных веществ. В качестве исследуемого вещества использовали дексаметазон (10^{-2} М, Sigma-Aldrich, США; конечная концентрация 10^{-4} М).

Определение уровня экспрессии генов-регуляторов ПКГ

После культивирования отбирали клеточную суспензию, гомогенизировали клеточный осадок в ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) (1 мл / 10 млн клеток), выделение РНК проводили по стандартному протоколу. Концентрацию и степень чистоты РНК определяли с помощью NanoDropLite (Thermo Fisher, США), образцы использовали при соотношении 260/280 нм ~ 2,0, 260/230 в диапазоне 2,0-2,2. Проводили синтез кДНК на матрице РНК с помощью набора РЕВЕРТА-Л (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). С помощью метода ПЦР в реальном времени определяли уровень экспрессии генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и генов-регуляторов аутофагии (*LC3*, *BECN1*), визуализировали с помощью красителя FAM. В качестве гена домашнего хозяйства для референсного значения использовали ген *ACTB* (краситель VIC). Праймеры для гена *ACTB*: Прямой – 5'-CACCATTTGGCAATGAGCGGTTC-3'; Обратный – 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'. *BCL2*: Прямой – 5'-GTGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3'; Обратный – 5'-CACCTACCCAGCCTCCGTTA-3'. *BECN1*: Прямой – 5'-CAGGAACACAGCTCCATTAC-3'; Обратный – 5'-CCATCCTGGCGAGTTTCAATA-3'. *CASP3*: Прямой – 5'-TGGCCCTGAAATACGAAGTC-3'; Обратный – 5'-GGCAGTAGTTCGACTCTGAAG-3'. *LC3*: Прямой – 5'-CTGGACTTCTTAGAGTTCGTT-3'; Обратный – 5'-CACСТААТCGCCTCCGТАА-3'.

Для основы реакции использовали TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher, США), содержащий Taq-полимеразу AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase, урацил-ДНК-гликозилазу, dNTP с dUTP, эталонный краситель ROX, буферные компоненты. На 1 пробу 5 мкл 2× Master Mix, Праймеры FaM-20× 0,5 мкл, Праймеры ViC-20× 0,5 мкл, dH₂O 2,0 мкл. Амплифицировали с помощью CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) при: 1 цикл при 95 °C (5 минут); 40 циклов при 95 °C (30 секунд), при 60 °C (30 секунд), при 72 °C (15 секунд). Для оцен-

ки уровня экспрессии генов и нормализации использовали дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$) метод.

Статистическая обработка результатов

Для математического анализа и визуализации полученных результатов использовали пакет программ GraphPad Prism 8.4.3.686 и PAST v. 3.17. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро–Уилка. Для анализа выборки, не поддающейся закону нормального распределения, использовали структурные характеристики (медиану, перцентили 2,5 и 97,5). Для оценки различий между отдельными выборками применяли непараметрические критерии Краскела–Уоллиса (для общей характеристики выборки), а после проводили множественные апостериорные сравнения с помощью теста Данна (Dunn's post hoc test). Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты

Определение вариантов *Bcl1* полиморфизма в группе пациентов с АБА

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

Сравнение экспрессии генов программируемой клеточной гибели

Мы оценили изменения экспрессии генов в лимфоцитах больных atopической бронхиальной астмы при различной длительности культивирования с добавлением и без добавления дексаметазона в зависимости от генотипа полиморфизма *Bcl1*. На рисунке 2 представлены относительные уровни экспрессии генов-регуляторов ПКГ.

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

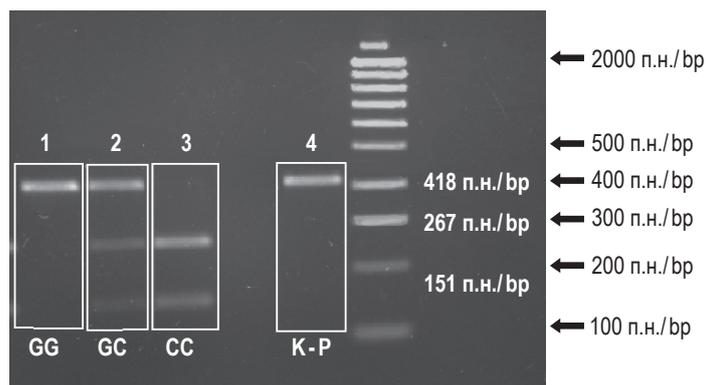


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК после рестрикции ПЦР-продуктов образцов больных астмой с различными генотипами полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*

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

Figure 1. Electrophoresis separation of *BclI* 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; 4, PCR-product without restriction (K -P); M, DNA HyLadder; bp, base pair.

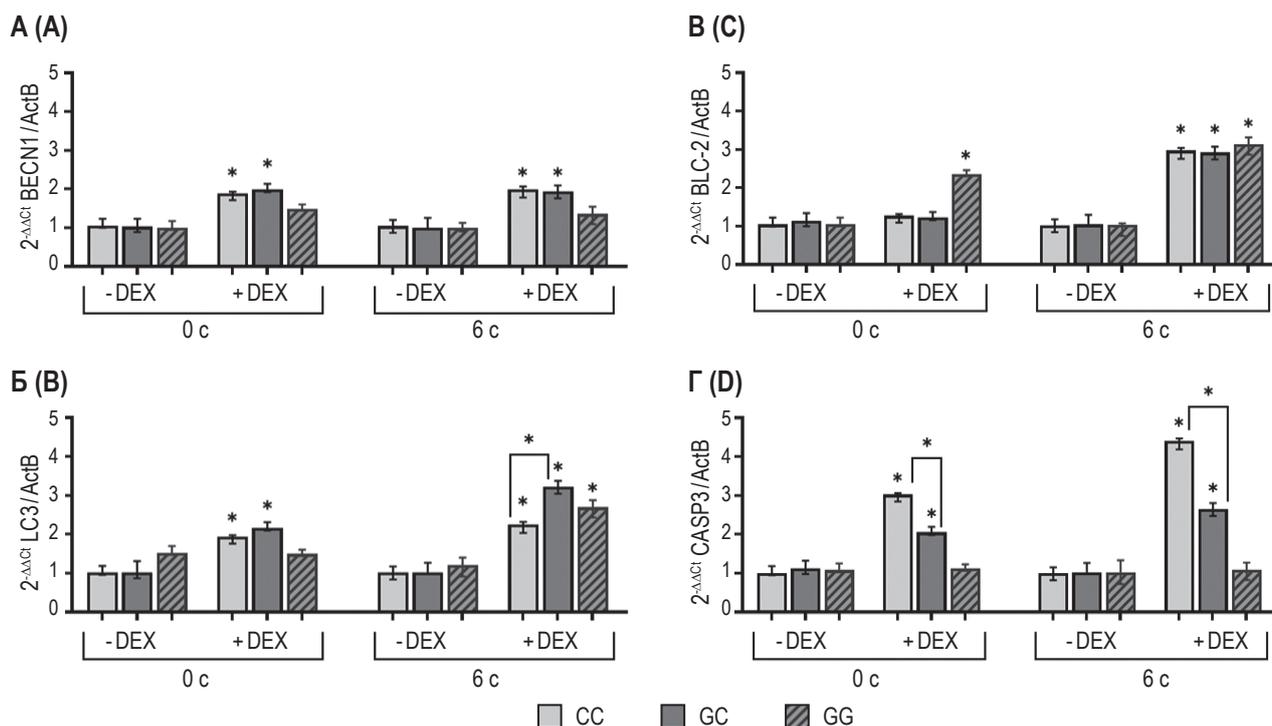


Рисунок 2. Уровни относительной экспрессии генов-маркеров программируемой клеточной гибели в лимфоцитах больных атопической бронхиальной астмой с CC, GC и GG-генотипами *Bcl1* полиморфизма гена *NR3C1*

Примечание. Уровни относительной экспрессии генов *BECN1* (A), *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-е сутки (0 c) и на 6-е сутки (6 c) культивирования. Статистически значимые различия при $p < 0,05$ внутри одной группы между образцами +DEX и -DEX обозначены *, дополнительные статистически значимые различия обозначены * с рамкой.

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

Note. 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.

При 2-часовом воздействии дексаметазона статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *BCL2* наблюдалось только в группе больных АБА с GG-вариантом *Bcl1* полиморфизма. При длительном культивировании с воздействием дексаметазона в лимфоцитах всех групп пациентов наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *BCL2*. Как при кратковременном, так и 6-дневном культивировании с дексаметазоном, в лимфоцитах группы больных с СС и GC-вариантами полиморфизма происходит статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *CASP3*, по сравнению с необработанным лекарством клетками. Активация апоптоза в клетках является нормальным эффектом глюкокортикоидного рецептора, однако в группе с GC-полиморфизмом (содержащем G-аллель, ассоциированный с более тяжелым течением АБА), уровень экспрессии *CASP3* меньше, чем в группе с СС-вариантом, ассоциированным с нормальным ответом на ГК. Что примечательно, в лимфоцитах группы с GG-вариантом полиморфизма, уровень экспрессии *CASP3* остается на прежнем уровне вне зависимости от времени воздействия дексаметазона на клетки.

Обсуждение

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

дыхательных путей, что приводит к снижению функции легких.

Продукт гена *BECN1* участвует в реакциях, определяющих баланс между апоптозом и аутофагией. После диссоциации белка Bcl-2, Beclin-1 переходит в активную форму и образует комплекс с VPS34 и другими белками-регуляторами аутофагии, в результате чего стимулируется наращивание липидной мембраны аутофагосомы, изолирование груза и завершается процесс нуклеации. Недостаток питательных веществ в культуральной среде индуцирует аутофагию и позволяет выявить нарушение этого процесса в клетках. Неизменный уровень экспрессии *BECN1* при подобных условиях в группе с GG вариантом полиморфизма может предполагать наличие у этой группы больных нарушения активации аутофагии, как способа программируемой клеточной гибели. Увеличение экспрессии гена LC3 может указывать на повышенную активацию аутофагии и образование аутофагосом. Аллель G ассоциирована с более тяжелым течением бронхиальной астмы, однако GC-вариант полиморфизма характеризуется резистентностью к терапии реже, чем GG-вариант [20]. Повышение уровня аутофагии демонстрирует нормальный физиологический ответ на недостаток питательных веществ, однако, учитывая нарушение последних этапов аутофагии у всей группы больных atopической бронхиальной астмой, процесс может усиливать аллергическое воспаление и отягощать симптоматическую картину [7, 23].

По-видимому, аутофагия играет уравновешивающую роль, призванную избежать чрезмерного повреждения легочной ткани, обеспечивая при этом защитный ответ против патогенов, что делает ее неоднозначной, но неоспоримо важной мишенью при терапии.

Было показано, что кортикостероиды уменьшают воспаление множеством способов, включая снижение продукции медиаторов воспаления и подавление иммунной системы за счет снижения активности и объема лимфоцитов [1]. Полиморфные варианты гена *NR3C1*, а также альтернативные молекулярные механизмы могут приводить к снижению экспрессии ГР- α , функциональной изоформы рецептора и, наоборот, повышению экспрессии нефункциональной изоформы ГР- β , неспособной связываться с гормонами и синтетическими ГКС. Помимо изменения уровня экспрессии активной и неактивной изоформы, генетические полиморфизмы и, как следствие, альтернативный сплайсинг могут приводить к дефектному связыванию ГКС с ГР- α [14, 22]. Помимо генетических полиморфизмов рецептора, одной из причин возникновения устойчивости, связанных с нарушением связывания ГК с ГР- α ,

можно считать фосфорилирование такими киназами, как MAPK и JNK, что препятствует его транслокации в ядро и активации транскрипции противовоспалительных генов [24]. Перечисленные механизмы имеют прочную связь с регуляцией программируемой гибели в клетке, и изменение структуры ГР может оказывать прямое влияние на апоптоз и аутофагию. Хорошо известно, что высокие дозы глюкокортикоидов вызывают апоптоз в Т-клетках, В-клетках, макрофагах, незрелых дендритных клетках, эозинофилах и в натуральных киллерах. При этом существует много типов клеток, которые устойчивы или антиапоптотически реагируют на глюкокортикоиды, а различные трансляционные изоформы GR α индуцируют апоптоз с разной скоростью [12].

Белок Bcl-2 участвует в регуляции как аутофагии, так и апоптоза, и поддерживает аутофагию в клетке на физиологическом уровне. В нормальных условиях белок Bcl-2 связан с белком Beclin-1, но в условиях недостатка питательных веществ (и влияния других стимулов индукции аутофагии, как механизма выживания), Bcl-2 диссоциирует от Beclin-1, освобождая его для дальнейшего каскада взаимодействий с белками аутофагии [15]. Повышение уровня экспрессии Bcl-2 может быть связано как с ингибированием аутофагии с целью удержания ее в физиологических пределах, так и с ингибированием апоптоза в ответ на сильную индуктивный проапоптотический эффект дексаметазона. Ассоциация GG-варианта полиморфизма с резистентностью к терапии ГК может объясняться данной активацией антиапоптотических механизмов даже в ответ на кратковременное воздействие лекарства. Однако сильная индукция аутофагии под воздействием недостатка питательных веществ в культуральной среде может активировать физиологические регуляторы, такие как Bcl-2, для стабилизации ПКГ в лимфоцитах пациентов со всеми вариантами по-

лиморфизма. Несмотря на это, анализы клеток, экспрессирующих различные уровни Bcl-2 и Bax, показали, что степень подавления апоптоза коррелирует с количеством Bcl-2, свободного от Bax, а не с общим количеством Bcl-2, что также может влиять на интерпретацию полученных результатов [21]. Наиболее значимые результаты исследования маркеров апоптоза были получены при оценке относительной экспрессии гена *CASP3*. Каспазы являются важнейшими медиаторами апоптоза, среди которых продукт гена *CASP3* является наиболее часто активируемой протеазой, катализирующей специфическое расщепление многих ключевых клеточных белков [8]. Отсутствие изменений уровня экспрессии *CASP3* в лимфоцитах группы с GG-вариантом полиморфизма демонстрирует толерантность таких иммунных клеток к воздействию дексаметазона. Подобная блокировка апоптотического ответа на глюкокортикоиды может служить одним из механизмов резистентности клеток к терапии и объяснять структурные и функциональные изменения, происходящие с полиморфным глюкокортикоидным рецептором.

Заключение

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

Список литературы / References

1. Abaya R., Jones L., Zorc J.J. Dexamethasone compared to prednisone for the treatment of children with acute asthma exacerbations. *Pediatr. Emerg. Care*, 2018, Vol. 34, no. 1, pp. 53-58.
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. *BMC Immunol.*, 2008, Vol. 9, 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. *BioNanoScience*, 2017, Vol. 7, pp. 269-271.
4. Ali F.R. Does this patient have atopic asthma? *Clin. Med.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 376-380.
5. Boonpiyathad T., Sözen Z.C., Satitsuksanoa P., Akdis C.A. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.*, 2019, Vol. 46, 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 response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, Vol. 173, no. 6, pp. 607-616.
7. Gorska M.M. Natural killer cells in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, pp. 50-54.

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.
9. Hamzaoui A., Hamzaoui K., Salah H., Chabbou A. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma. *Mediators Inflamm.*, 1999, Vol. 8, no. 4-5, pp. 237-243.
10. Henderson I., Caiazza E., McSharry C., Guzik T.J., Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 160, 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*, 2000, Vol. 5, no. 5, pp. 459-471.
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. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 20, pp. 7143-7160.
13. Lu N.Z., Cidlowski J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, Vol. 1024, pp. 102-123.
14. Marquez R.T., Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 214-221.
15. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 22, pp. 2861-2873.
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. *Egypt. J. Pediatr. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 18, pp. 71-77.
17. Murdoch J.R., Lloyd C.M. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Res.*, 2010, Vol. 690, no. 1-2, pp. 24-39.
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. *Exp. Ther. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 2, pp. 572-580.
19. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 460-473.
20. Pietras T., Panek M., Tworek D., Oszejca K., Wujcik R., Górski P., Kuna P., Szemraj J. The Bcl I single nucleotide polymorphism of the human glucocorticoid receptor gene *h-GR/NR3C1* promoter in patients with bronchial asthma: pilot study. *Mol. Biol. Rep.*, 2011, Vol. 38, no. 6, pp. 3953-3958.
21. Potapinska O., Demkow U. T lymphocyte apoptosis in asthma. *Eur. J. Med. Res.*, 2009, Vol. 14, Suppl. 4, pp. 192-195.
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. *Mol. Cell. Biol.*, 2013, Vol. 33, no. 9, pp. 1711-1722.
23. Theofani E., Xanthou G. Autophagy: a friend or foe in allergic asthma? *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 12, 6314. doi: 10.3390/ijms22126314.
24. Weigel N.L., Moore N.L. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol. Endocrinol.*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2311-2319.

Авторы:

Богомазова А.А. — магистр кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Решетникова И.Д. — к.м.н., заместитель директора по научной работе ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»; доцент кафедры внутренних болезней ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Bogomazova A.A., Master Student, Research Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine), Deputy Director for Research, Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Associate Professor, Department of Internal Medicine, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Скибо Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Имунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Имунопатология» ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Skibo Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Chief Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 30.08.2023
Отправлена на доработку 11.09.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 30.08.2023
Revision received 11.09.2023
Accepted 04.10.2023