

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АУТОФАГИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ
(НА МОДЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ
БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ)

Абрамова З.И., Скибо Ю.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра биохимии

Основным принципом функционирования физиологических систем является поддержание целостности организма. На клеточном уровне данный процесс реализуется за счет постоянного равновесия между такими физиологическими процессами как: пролиферация, дифференцировка и программируемая клеточная гибель (ПКГ). Нарушение одного из них может стать причиной развития патологии.

Наиболее изученной формой гибели клеток является апоптоз, который отвечает за удаление старых и поврежденных клеток. Апоптоз может быть инициирован как физиологическими, так и патологическими стимулами. Основные характеристики апоптоза включают: **Сжатие клетки**. Клетка уменьшается в размерах; цитоплазма уплотняется; органеллы располагаются более компактно. **Конденсация хроматина**. Это наиболее характерное проявление апоптоза. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом образуются четко очерченные плотные массы различной формы и размеров. Ядро же может разрываться на два или несколько фрагментов. Конденсация хроматина обусловлена расщеплением ядерной ДНК в местах, связывающих отдельные нуклеосомы, что приводит к развитию большого количества фрагментов, в которых число пар оснований делится на 180-200. При электрофорезе фрагменты дают характерную картину лестницы. Именно на выявлении фрагментации ДНК основаны биохимические тесты на апоптоз.

Формирование в цитоплазме полостей и апоптотических телец. В апоптотической клетке первоначально формируются глубокие впячивания поверхности с образованием полостей, что приводит к фрагментации клетки и формированию окруженных мембраной апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д.

Аутофагия - это эволюционно консервативный катаболический процесс, который позволяет переваривать клеточные компоненты. Существует три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия.

При шаперон-опосредованной аутофагии происходит направленный транспорт денатурировавших белков из цитоплазмы в лизосомы, где они перевариваются. Этот тип аутофагии происходит при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства hsc-70 и вспомогательных белков LAMP-2, который служит мембранным рецептором комплекса шаперона и белка, подлежащего транспорту в лизосому.

При микроаутофагии образуются впячивания мембраны эндосомы или лизосомы, которые затем отделяются в виде внутренних пузырьков. Таким путем клетка может переваривать белки при нехватке энергии или при голодании.

Макроаутофагия (зачастую говоря об аутофагии, подразумевается именно макроаутофагия) связана с формированием *de novo* в клетках специализированных структур – аутофагосом, внутри которых происходит деградация органелл и цитоплазматического материала. Аутофагосомы это двухмембранные образования, внутри которых помещается клеточный материал, подлежащий разрушению. При слиянии аутофагосом с лизосомами образуются аутофаголизосомы, где и происходит расщепление подлежащих уничтожению компонентов клетки.

Стимулами к запуску процессов аутофагии в клетках являются: отсутствие факторов роста или нехватки питательных веществ, наличие в цитоплазме поврежденных органелл, например, митохондрий, пероксисом и т.д.; возникновение монослоя в клеточных культурах и существование контактного торможения и т.д.

Одним из самых распространенных стимулов запуска аутофагии является нехватка питательных веществ и в этом смысле, отсутствие любого типа необходимых питательных веществ может вызвать аутофагию. У дрожжей азотное голодание является наиболее мощным стимулом. Азотное или углеродное голодание также вызывает аутофагию в клетках растений.

Аутофагия была описана в то же время, что и апоптоз, но долгое время она воспринималась как механизм поддержания функционирования клетки в стрессовых условиях, за счет переваривания собственных внутриклеточных компонентов. Исследования последних лет показали, что аутофагия может быть механизмом гибели клеток (ПКГ по типу II).

Взаимодействие между аутофагией и апоптозом является установленным фактом. Однако механизмы, посредством, которого происходит переключение с одного процесса на другой, не до конца ясны.

Бронхиальная астма относится к группе хронических воспалительных заболеваний, в развитии которого установлено усиление выживаемости Т-лимфоцитов вследствие утратой ими способности к апоптозу. Устойчивость Т-лимфоцитов к апоптозу может быть связана с активацией аутофагии.

В основе патогенеза атопической бронхиальной астмы ведущая роль принадлежит Т-лимфоцитам, из-за их высокого содержания. Одной из причин длительного функционирования данной субпопуляции является устойчивость клеток к апоптозу.

Поэтому мы провели анализ содержания Т-лимфоцитов в периферической крови. Сравнительный анализ показал отсутствие различий в содержании Т-клеток в исследуемых группах. Как известно, популяция Т-лимфоцитов представлена двумя субпопуляциями: Т-хелперами и цитотоксическими Т-лимфоцитами. Анализ субпопуляционного состава показал, что группа с тяжелой формой АБА характеризуется снижением содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и повышением Т-хелперов. Увеличение Т-хелперов в свою очередь приводит к повышению В-лимфоцитов, которые дифференцируясь в плазмциты, способны секретировать иммуноглобулины. Анализ иммуноглобулинового состава выявил значимое повышение IgE, что с высокой вероятностью указывает на наличие

аллергического процесса. Повышение всех показателей свидетельствует о вовлеченности гуморальных звеньев адаптивного иммунитета в патогенез заболевания.

Любое изменение в функциональном состоянии клеток отражается на их морфологии. Поэтому на следующем этапе исследований была поставлена задача: охарактеризовать морфологические особенности Т-лимфоцитов.

Морфологическое состояние Т-лимфоцитов в контрольной группе указывает на функционально-активное состояние клеток, что проявляется в наличии микроворсинок, повышенном содержании митохондрий и наличии крупного ядра округлой формы, занимающее почти весь объем клетки. Результаты ТЭМ согласовывались с результатами АСМ, которая также позволяет анализировать поверхность исследуемого образца. На АСМ микрофотографиях хорошо заметно, что плазматическая мембрана отличается ровным упорядоченным рельефом; выявляются глобулярные структуры, которые могут соответствовать плазматическим белкам.

В группе с легкой формой АБА установлено формирование инвагинаций плазматической мембраной, уменьшение размеров ядра, конденсация хроматина и наличие аутофагосом в клетках. Наряду с изменением морфологии клеток, меняется плазматическая мембрана: увеличивается количество глобулярных структур, но при этом размер их уменьшается.

В группе с тяжелой формой также отмечено изменение в морфологии клеток: формирование глубоких инвагинаций как клеточной, так и ядерных мембран, наличие блеббингов, вакуолей в клетке, что свидетельствует о высокой секреторной активности клеток. Отмечается изменение поверхности клеток.

Таким образом, на данном этапе исследований мы показали изменение не только функционального состояния клеток, проявляющегося в повышенном содержании CD4+ Т-лимфоцитов в группе с тяжелой формой, но и изменение морфологических параметров Т-лимфоцитов. Все выявленные особенности могут являться следствием нарушения клеточной гибели Т-лимфоцитов.

На следующем этапе работы была поставлена задача охарактеризовать биохимические и морфологические параметры апоптоза и аутофагии. В процессе культивирования клетки оказываются в стрессовых условиях из-за снижения питательных компонентов в среде, вследствие чего запускается процесс апоптоза. В качестве индуктора апоптоза был использован дексаметазон, синтетический глюкокортикоид, входящий в группу терапевтических веществ, назначаемых больным астмой.

Анализ биохимических параметров апоптоза показал, что на 3 сутки содержание апоптотических Т-лимфоцитов в группах больных АБА было ниже относительно контроля. Добавление Декс стимулировало ранние и поздние проявления апоптоза в контроле и у больных легкой формой АБА и не влиял на лимфоциты больных тяжелой формой. На 6 сутки возрастала устойчивость Т-клеток к апоптозу в группах с легкой и тяжелой формами АБА.

Таким образом, анализ биохимических показателей апоптоза выявил устойчивость Т-клеток больных астмой к апоптозу в условиях стресса.

Затем был проведен морфологический анализ Т-клеток, находящихся в культуре. Большая часть Т-лимфоцитов здоровых доноров обладает морфологией, соответствующей апоптотическим изменениям на ранней стадии процесса, а именно отсутствие микроворсинок, конденсация хроматина по периферии ядра. Добавление дексаметазона стимулировало поздние этапы апоптоза (инвагинация ядерной и плазматической мембран, конденсация хроматина, наличие апоптотических телец в среде), что согласовывалось с результатами биохимического анализа апоптоза.

Анализ микрофотографий Т-лимфоцитов больных легкой формой АБА показал, что большая часть клеток сохраняет типичную морфологию пролиферирующих клеток. Но при этом обнаружены крупные аутофагосомы, внутри которых достаточно хорошо детерминированы различные клеточные компоненты. Кроме того, были обнаружены фрагменты погибших клеток, в которых большая часть содержимого представлена аутофагосомами. Это свидетельствует о запуске ПКГ по типу II или аутофагической гибели.

Таким образом, в условиях снижения апоптотической активности в Т-клетках больных легкой формой астмы инициируется программа аутофагии, способствующая гибели клеток и поддержанию клеточного гомеостаза в целом. Культивирование Т-лимфоцитов больных легкой формой заболевания с дексаметазоном сказывалось на стимулировании ранних этапов апоптоза. Проявления аутофагии не были установлены.

В группе с тяжелой формой АБА отмечена одновременная активация аутофагии и апоптоза. Добавление дексаметазона способствовало интенсивной активации аутофагии, что проявлялось в увеличении содержания и размера аутофагии в клетках. При этом отсутствовали морфологические признаки апоптоза. По данным морфологического анализа следует, что снижение питательных веществ в среде стимулирует индукцию апоптоза у здоровых доноров и активацию аутофагии у больных АБА.

Биохимическим маркером аутофагии является белок LC3B, который экспрессируется на мембране аутофагосомы. LC3 белок присутствует в цитозоле большинства типов клеток. При запуске аутофагии он протеолитически разрушается, образуя LC3-I изоформу. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC3-II формы, которая располагается на внутренней и внешней мембране аутофагосомы. Поэтому, количество LC3-II хорошо коррелирует с числом аутофагосом. Эта характеристика преобразования LC3 может быть использована для мониторинга аутофагии.

Используя различные флуоресцентные красители, можно детектировать наличие аутофагосом в клетке. В результате проведенных исследований мы установили, что в Т-лимфоцитах здоровых доноров экспрессия LC3B белка отсутствует. У больных как с легкой, так и с тяжелой формой АБА, выявлено наличие аутофагосом в Т-клетках, однако их количество и интенсивность экспрессии белка выше в группе больных с тяжелой формой астмой.

Методом проточной цитометрии был определен уровень экспрессии данного белка в лимфоцитах, который показал, что содержание белка повышалось с увеличением тяжести заболевания.

Мы также провели анализ содержания двух изоформ LC3 белка. Который показал, что I изоформа белка представлена во всех группах. И лишь в группе с тяжелой формой обнаружена II изоформа белка, связанная с аутофагосомами. Добавление дексаметазона способствовало переходу I изоформа LC3 белка во II форму.

Итак, полученные результаты позволяют говорить, что процесс программированной клеточной гибели Т-лимфоцитов при развитии атопической бронхиальной астмы не так однозначен, как считалось ранее. Помимо апоптоза, свой вклад в патологическое развитие астмы может вносить аутофагия.

Устойчивость к апоптозу Т-клеток больных легкой формой АБА способствует активации аутофагии, которая приводит к запуску ПКГ II типа и сохранению гомеостаза организма в целом.

В Т-лимфоцитах больных тяжелой формой АБА установлена одновременная активация апоптоза и аутофагии, способствующая длительному функционированию Т-клеток, персистенции заболевания и ее более тяжелым проявлениям.

(Презентация прилагается)