

УДК 577.152.314:576.312

**ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

*З.И. Абрамова, М.М.Д. Нсангу, В.Г. Винтер*

**Аннотация**

Изучены цитоплазматические и ядерные белки лимфоцитов здоровых доноров и больных бронхиальной астмой. В апоптотирующих клетках периферической крови здоровых доноров выявлена ДНКаза, активируемая ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Лимфоциты больных бронхиальной астмой содержат ДНКазы, активность которых изменяется в зависимости от тяжести заболевания. В клетках больных возрастает активность  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой ДНКазы и подавляется активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой ДНКазы. Учитывая роль  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой ДНКазы в апоптозе клеток, можно выдвинуть предположение о взаимосвязи торможения апоптоза лимфоцитов больных бронхиальной астмой с нарушением индукции «апоптотической»  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой нуклеазы.

**Введение**

Хронические обструктивные болезни легких (ХОБЛ) включают гетерогенную по своей природе группу легочных заболеваний – бронхиальная астма, эмфизема, хронический обструктивный бронхит, которые объединяет расстройство функций внешнего дыхания легких по обструктивному типу. Эти заболевания входят в число лидирующих причин по числу нетрудоспособности, инвалидности и занимают четвертое-пятое место в мире среди других причин смерти. В России данные медицинской статистики свидетельствуют о том, что болезни органов дыхания занимают по распространению первое место: 15073.2 на 100000 населения, далее следуют сердечно-сосудистые заболевания – 14385.4, нервной системы – 13491.0 [1]. Первичные механизмы патогенеза ХОБЛ находятся на молекулярно-клеточном уровне [2]. Именно этот уровень определяет индивидуализацию клинических проявлений ХОБЛ у больных. Несмотря на то, что патогенез гиперреактивности бронхов, возникающий на первой стадии воспаления, до настоящего времени полностью не ясен, предполагается, что он возникает в результате сложного взаимодействия Т-лимфоцитов, нейтрофилов, тучных клеток, макрофагов и тромбоцитов. Убедительно показано, что лимфоциты и другие клетки, мигрировавшие в легочную ткань, имеют строго определенный срок жизни, по истечению которого они подвергаются элиминации посредством запуска процесса их запрограммированной клеточной гибели или апоптоза [3–5]. Исследования процессов апоптоза лимфоцитов у больных бронхиальной астмой свидетельствуют об относитель-

ной устойчивости данных клеток к апоптозу, что проявляется в замедлении фрагментации ДНК этих клеток при инкубации в среде *in vitro* [6, 7].

В свете этих данных объяснимо то внимание, которое уделяют ученые роли нуклеаз в апоптозе клеток. Польские ученые [8] выдвинули гипотезу, что важнейшим этапом апоптоза является активация нуклеаз. В работе [9] показано, что физико-химические характеристики двух нуклеаз – nuc-58 и nuc-40 – позволяют назвать их ДНКазами, ассоциирующимися с апоптозом в цитолитических Т-лимфоцитах. Позднее было показано [10], что активность нуклеаз в клетках может зависеть от двух белковых молекул – неустановленной апоптотической нуклеазы (мол. масса – 40000) и кислого белка (мол. масса – 30000), который стабилизирует и инактивирует нуклеазу. В работе [11] сообщается о ДНКазе человека, которая отличается от других предполагаемых апоптотических нуклеаз тем, что установлена ее ядерная локализация. Высказывалось предположение, что в качестве апоптотической могут выступать: RpS3, ДНК репарирующая эндонуклеаза [12], ДНКаза-гамма, выделенная из ядер тимоцитов, находящихся на стадии апоптоза, вызванного радиационным облучением, которая затем была обнаружена при апоптозе Т-лимфоцитов при болезни Кукуши [13].

Учитывая выше изложенное, мы изучили нуклеазную активность лимфоцитов – основных клеток-эффекторов иммунной системы организма при бронхиальной астме.

### 1. Условия эксперимента

Объектом исследования являлись лимфоциты периферической крови 20 больных бронхиальной астмой (БА) и 20 здоровых доноров. Диагноз атопической формы аллергического заболевания подтверждался аллергологическим анамнезом, положительными результатами кожных скарификационных и, в ряде случаев, внутрикожных проб с аллергенами.

Лимфоциты выделяли равновесным центрифугированием на преформированном градиенте перколла ( $\rho$  1.105, 1.095, 1.090, 1.085, 1.077, 1.070). В результате очистки степень чистоты полученных фракций лимфоцитов составила 85–94%.

Оценка апоптоза лимфоцитов осуществлялась методом проточной цитофлуориметрии на приборе Facscon (Becton Dickinson), который позволяет измерить процент апоптотических ядер после окраски пропидиум иодата. Апоптоз ядер определяется по ширине пика гиподиплоидной ДНК, который легко отличить от узкого пика клеток с нормальной (диплоидной) ДНК. Для исследования апоптоза лимфоциты переносили в среду RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотики, инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. В качестве индукторов апоптоза использовали дексаметазон, вводимый в культуральную среду до концентрации 5 мкМ.

Для получения белковых фракций использовали метод фракционирования белков хроматина лимфоцитов, основанный на последовательной диссоциации цитоплазматических и ядерных белков в растворах NaCl возрастающей ионной

силы. В результате при ступенчатом увеличении ионной силы раствора диссоциируются только определенные фракции белков. Для диссоциации использовали 0.01, 0.15, 0.4 М растворы NaCl в 0.01 М трис-буфере, pH 7.2.

Для амплификации ДНК pBR 322 использовали бактериальную культуру *Escherichia coli* Hb 101 – pBR 322. Сбор бактерий, их лизис и выделение проводили по методу [15]. ДНК pBR 322 очищали от РНК гель-хроматографией на колонке Sepharose CL-4B.

Ферментативную активность исследуемых белковых фракций определяли по приросту продуктов гидролиза ДНК. Активность выражали в спектрофотометрических единицах увеличения кислоторастворимых продуктов при гидролизе нативной ДНК или денатурированной ДНК при длине волны 260 нм за 60 мин. инкубации при 37°C на 1 мг белка (удельная активность) или на 1 мл ферментного раствора (общая активность).

Специфичность отношения ДНКаз ко вторичной структуре ДНК изучали электрофорезом в 0.7 %-ном агарозном геле, используя суперспиральную ДНК pBR 322 (форма I) и регистрируя переход формы I через форму II (открытое ковалентно-замкнутое кольцо) до формы III (линейная ДНК). Инкубационная проба содержала 100 мкл ДНК pBR 322 (20–50 мкг/мл) / 60 мкл 0.2 М трис-буфера (pH 7.2–7.3) / 20 мкл 0.025 MnCl<sub>2</sub> или MgCl<sub>2</sub> (50 мкМ) и CaCl<sub>2</sub> (1 мкМ). Концентрация белка-фермента в исследуемых фракциях здоровых доноров и больных уравнивалась и составляла 0.45–1.0 мкг/мл. Реакцию останавливали добавлением 10%-ного раствора ДДС-Na / 0.1%-ного бромфенолового синего / 50%-ного глицерина. Контролем перехода форм ДНК служила проба ДНК, содержащая смесь форм I, II и III. Электрофорез проводили в горизонтальном направлении на пластинах размером 10×10×3 мм при силе тока 4 мА/см в течение 1.0–1.5 ч при 20°C. Белковые полосы выявляли на ультрамикроскопе после окраски гелей в растворе этидиум бромид (2 мкг/мл) в течение 40 мин.

Количественную оценку изменения активности ДНКаз (скорости гидролиза ДНК) больных бронхиальной астмой в зависимости от стадии развития болезни и здоровых доноров проводили флуориметрическим методом [16], определяя  $T_{1/2}$  – время (в секундах), за которое 50% молекул ДНК (форма I) приобретают однонитевые разрывы. Для оценки результатов электрофоретического изучения продуктов реакции, полученных *in vitro*, использовали программу Imag Master, разработанную фирмой Pharmacia Biotech. Сканирование электрофореграмм проводили на сканере Sharp JX-330. В результате сканирования электрофореграмм формируется графическое (в виде пиков) изображение форм перехода ДНК и оценивается их площадь в процентах.

Для оценки достоверности полученных данных использовали двухвыборочный *t*-тест для различных дисперсий.

## 2. Результаты исследования

Для апоптозирующих клеток характерна межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК, приводящая *in vivo* к образованию апоптотических телец. Нами проведено исследование оптических характеристик выделенных из периферической крови лимфоцитов больных (показателей прямого и бокового рассея-

ния – FSC и SCC), которые отличались от характеристик клеток относительно здоровых доноров. Результаты исследований показали, что инкубация лимфоцитов периферической крови больных бронхиальной астмой (рис. 1) и здоровых доноров (рис. 2) *in vitro* приводит с течением времени клетки к гибели. Часть клеток погибает по типу апоптоза. При этом отмечено, что количество клеток (в %) с гиподиплоидной ДНК через 72 ч инкубации среди лимфоцитов от здоровых доноров выше, чем среди лимфоцитов от больных бронхиальной астмой. При индуцированном апоптозе лимфоцитов от больных количество клеток с гиподиплоидной зоной увеличивалось незначительно по сравнению с лимфоцитами от здоровых доноров, что свидетельствовало об устойчивости лимфоцитов больных бронхиальной астмой к спонтанному апоптозу.

Полученную фракцию лимфоцитов использовали для изучения нуклеазной активности белков.

Определенные сложности при фракционировании белков лимфоцитов человека связаны с малым количеством получаемых клеток и проблемой сохранения целостности ядер при получении цитоплазматических и ядерных белков. Мы применили метод фракционирования белков хроматина, основанный на последовательной диссоциации белков в растворах NaCl возрастающей ионной силы, и использовали для этого 0.01, 0.15 и 0.4 М растворы NaCl в 0.01 М трис-буфере, pH – 7.2. Находящиеся в физиологической среде лимфоциты больных астмой после концентрирования и центрифугирования промывали в 0.32 М растворе сахарозы на 0.01 М трис-буфере (pH 7.2), содержащем 0.003 М CaCl<sub>2</sub>. Это сохраняло структуру лимфоцитов, затем осадок клеток промывали в трис-буфере с Ca<sup>2+</sup>, растирали в стеклянном гомогенизаторе Поттера, заливали 5-кратным объемом этого же буфера, содержащего 0.01 М NaCl. После экстракции и центрифугирования получали фракцию цитоплазматических белков (фракция 0.01). Оставшийся осадок заливали одним объемом буфера без Ca<sup>2+</sup>, в результате ядра лизировались. Полученный нуклеопротеид последовательно экстрагировали буферами с различной ионной силой. Таким образом, было получено три белковые фракции лимфоцитов: фракция 0.01 (белки цитоплазмы), фракция 0.15 и фракция 0.4. При определении ДНКазной активности в них выяснилось, что после добавления к гомогенату лимфоцитов больных ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> ДНКазная активность не обнаруживалась. При добавлении ионов Mn<sup>2+</sup> белки гомогената слабо гидролизовали высокополимерную нативную ДНК, но достаточно активно гидролизовали денатурированную ДНК. Удельная активность Mn<sup>2+</sup>-зависимой ДНКазной активности гомогената составила, примерно, 4.0 ед. на мг белка. В отдельных белковых фракциях также была обнаружена ДНКазная активность, в частности, во фракции 0.4 она составила около 50 ед. на мг белка.

Таким образом, следует отметить, что в лимфоцитах больных более активно проявляется Mn<sup>2+</sup>-зависимая ДНКазная активность.

Для изучения отношения ДНКазной активности ко вторичной структуре ДНК мы использовали плазмидную ДНК pBR 322, на 90% представленную суперспиральной ДНК (форма I) (рис. 3), и активаторы – ионы Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>.

Результаты показали, что в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> все фракции белков лимфоцитов больных проявляли ДНКазную активность.

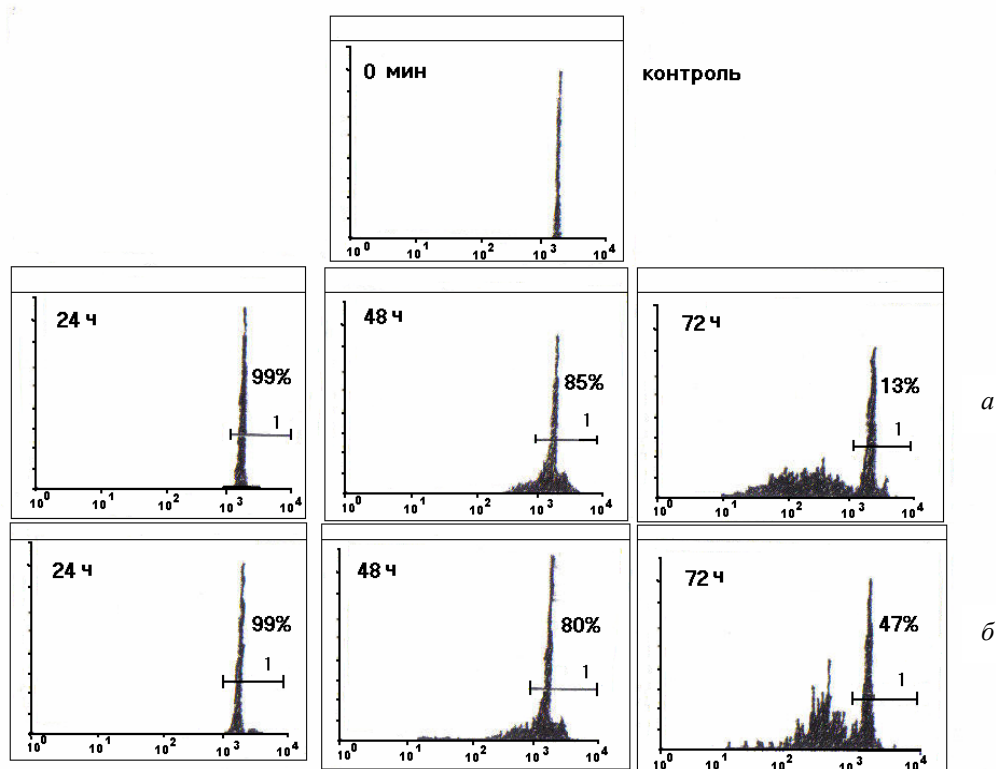


Рис. 1. Интенсивность спонтанного (а) и индуцированного (б) апоптоза лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Оценивается количество клеток (в %) с гиподиплоидной ДНК (количество гиподиплоидной ДНК определяется по ширине пика на гистограмме)

Однако продукты реакции регистрировались только через 10–15 мин. после начала реакции. Отмечено, что если при добавлении к суперспиральной ДНК (форма I) белков цитоплазмы (фракция 0.01) через 15 мин. кроме кольцевой открытой ДНК (форма II) образуются молекулы линейной ДНК (форма III), то при взаимодействии белков хроматина (фракция 0.15) с суперспиральной ДНК линейная ДНК появляется только через 60–90 мин. после начала реакции. Во фракции 0.4 ДНКазой активности, переводящей ДНК формы II в линейную ДНК (форма III), обнаружено не было. Во всех случаях ДНКазы лимфоцитов здоровых доноров в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  активнее гидролизовала субстрат, чем ДНКазы лимфоцитов больных бронхиальной астмой.

Иная картина наблюдалась при инкубации ДНК с белковыми фракциями лимфоцитов в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$ . Продукты реакции выявлялись уже через 0.5–2.0 мин., причем ДНКазы фракции 0.01 (рис. 4) и 0.15 (рис. 5) гидролизировали суперспиральную ДНК до линейных молекул, а ДНКазы фракции 0.4 (рис. 6) – суперспиральную ДНК рВР 322 только до «открытого» кольца. Это позволило сделать предположение, что ДНКазы фракции 0.4 лимфоцитов имеет предпочтение к денатурированной ДНК и является эндонуклеазой.

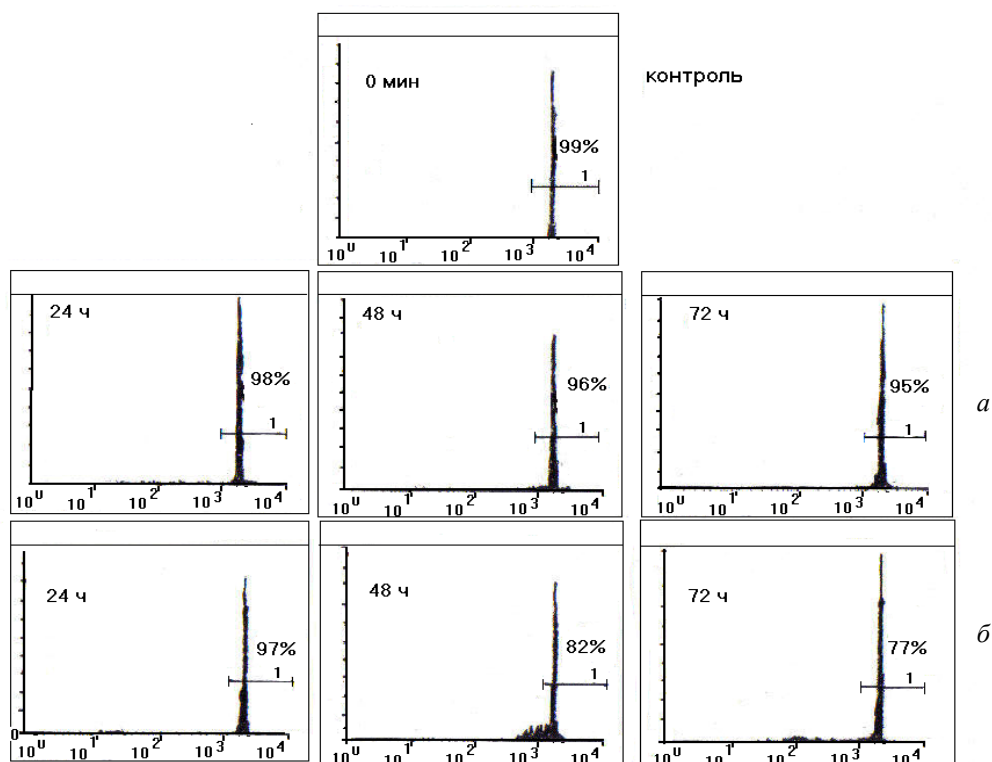


Рис. 2. Интенсивность спонтанного (а) и индуцированного (б) апоптоза лимфоцитов больных астмой. Пояснения – на рис. 1

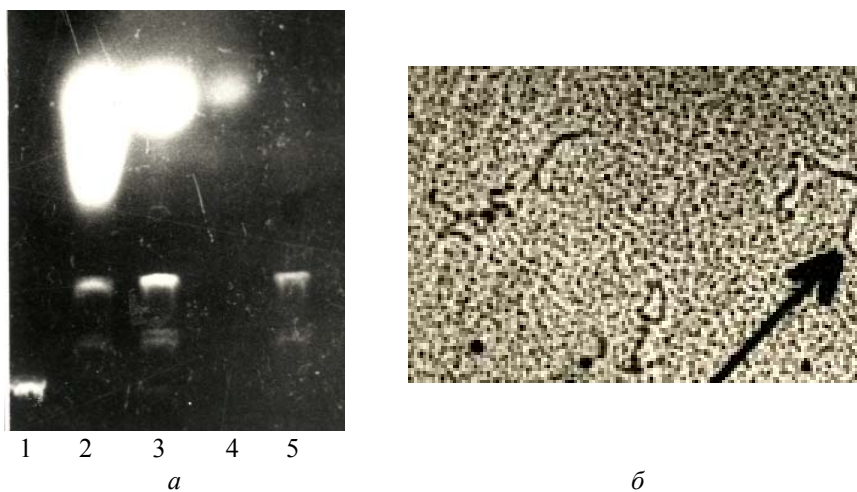


Рис. 3. (а) Этапы очистки ДНК рВR 322: 1 –  $\lambda$ -ДНК (контроль), 2 – ДНК после обработки фенолом, 3 – ДНК после обработки ацетатом аммония, 4 и 5 – РНК и ДНК после хроматографии на сефарозе 4В соответственно (электрофорез в 0.7%-ном агарозном геле). (б) Электронно-микроскопическое изображение ДНК рВR 322 после очистки на сефарозе 4В (форма I – стрелка)

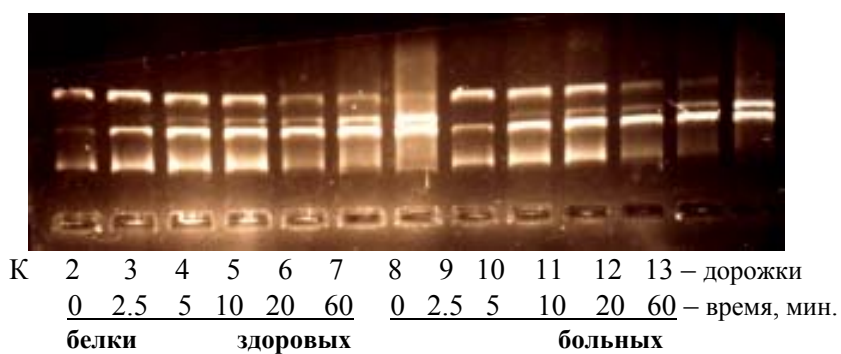


Рис. 4. Продукты гидролиза ДНК рBR 322 белками цитоплазмы лимфоцитов (фракция 0.01) в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ ; К – субстрат до реакции

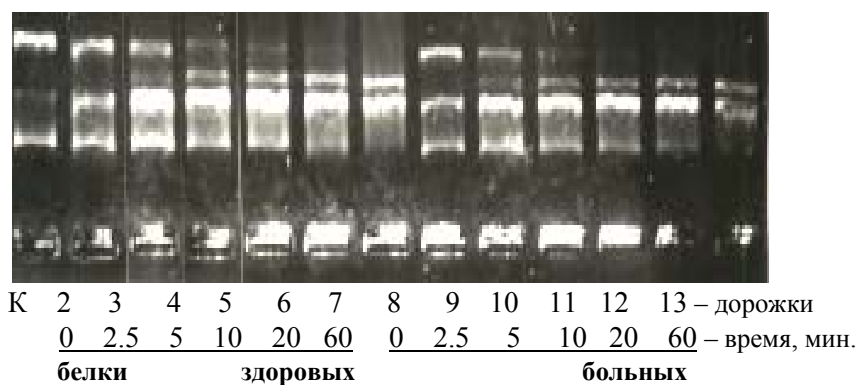


Рис. 5. Электрофореграмма ДНК рBR 322 после гидролиза белками фракции 0.15 лимфоцитов в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ ; К – субстрат до реакции

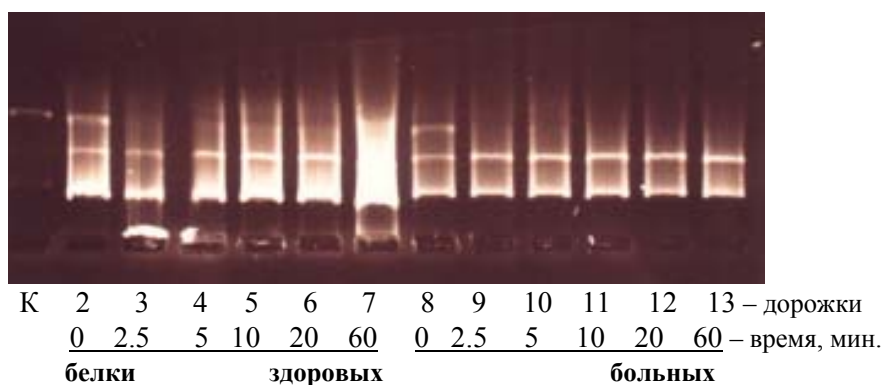


Рис. 6. Электрофореграмма ДНК рBR 322 после гидролиза белками фракции 0.4 лимфоцитов в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ ; К – субстрат до реакции

Табл. 1

Количественная оценка продуктов реакции гидролиза ДНК рBR 322 белками фракции 0.01

Здоровый донор								Больной донор						
№ дорожки	К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Время, мин.		0	2.5	5	10	20	60	0	2.5	5	10	20	60	
Форма	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Д	I	78	63	56	54	27	20	12	74	54	40	32	11	2
Н	III			4	8	16	41	49		6	10	14	22	47
К	II	22	37	40	38	57	39	39	26	40	50	54	67	51

Табл. 2

Количественная оценка продуктов реакции ДНК рBR 322 с белками фракции 0.15

Здоровый донор								Больной донор						
№	К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Время мин.		0	2.5	5	10	20	60	0	2.5	5	10	20	60	
Форма	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Д	I	80	66	22	12	5	3	2	62	35	13	11	5	2
Н	III			5	8	10	15	28		5	28	32	36	59
К	II	20	34	73	80	85	82	70	38	60	59	57	59	39

Небольшое количество линейных молекул появлялось только через 60 мин. после начала реакции (рис. 6). Продолжение инкубации до 120 мин. не приводило к полному переходу кольцевой ДНК в линейную. Такую устойчивость релаксированной кольцевой ДНК к действию ДНКазы фракции 0.4 лимфоцитов нельзя было объяснить недостаточной дозой белка (0.45 мкг/мл), так как добавление десятикратного количества белка-фермента не приводило к значительному увеличению количества линейной ДНК (форма III).

Поэтому устойчивость ДНК формы II к обнаруженному ферменту мы объясняем тем, что ДНКазы специфична к однонитевым участкам ДНК, и при переходе ДНК из формы I в форму II в результате единичного разрыва, когда происходит мгновенное восстановление водородных связей в денатурированных участках, такая ДНК приобретает устойчивость к этому ферменту.

Таким образом, ДНКазы фракции 0.4 лимфоцитов напоминает  $Mn^{2+}$ -зависимую эндоДНКазу печени крыс, описанную ранее в Казанском университете [17, 18].

Количественная оценка продуктов реакции (табл. 1–3) показала, что ДНКазы цитоплазмы (фракция 0.01) и хроматина (фракция 0.4) из лимфоцитов больных бронхиальной астмой и здоровых доноров незначительно различаются по активности (табл. 1 и табл. 3 соответственно).

Более выраженные различия выявлены во фракциях белков-ферментов здоровых доноров и больных, экстрагируемых при ионной силе 0.15 М NaCl (фракция 0.15). Из табл. 2 следует, что ДНКазы лимфоцитов больных почти в 2 раза



Табл. 3  
Количественная оценка продуктов реакции ДНК рВР 322 с белками фракции 0.4

Здоровый донор								Больной донор					
№	К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Время, мин		0	2.5	5	10	20	60	0	2.5	5	10	20	60
Форма	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Д	I	77	64					63	1				
Н	III												
К	II	23	36	100	100	100	100	37	99	100	100	100	100

активнее гидролизуют ДНК формы I до формы III. Но если ДНКазы больных активнее переводит ДНК формы II в форму III (т. е. идет активная фрагментация ДНК), то ДНКазы здоровых доноров активнее переводит ДНК формы I в форму II и далее гидролиз этой формы значительно замедляется.

Таким образом, можно предположить, что ДНКазы, ответственные за фрагментацию ДНК в апоптотических клетках при бронхиальной астме, локализуются во фракциях белков, связанных с хроматином.

Флуорометрический метод определения специфических и неспецифических эндонуклеаз основан на способности этидиум бромид (2,4-диамино-10-этил-9-фенилфенантрен бромид) интеркалировать между двумя парами оснований нативной ДНК. В случае взаимодействия этидиум бромид с ковалентно-замкнутой ДНК, когда свободного вращения нитей ДНК относительно друг друга не происходит, только незначительное количество красителя может интеркалировать между основаниями ДНК.

Следовательно, число молекул этидиум бромид, связанного на нуклеотид линейной ДНК, всегда больше числа молекул этидиум бромид, связанного замкнутой кольцевой ДНК аналогичного молекулярного веса. Таким образом, единичный разрыв в кольцевой ДНК в результате действия ДНКаз приводит к появлению свободных концов ДНК, что сопровождается увеличением количества молекул этидиум бромид, связанных с ДНК, и, соответственно, интенсивности флуоресценции. Кроме определения активности эндонуклеаз, данный метод позволяет судить о чистоте препаратов эндонуклеаз. Так, если в препарате эндонуклеазы присутствует экзонуклеазная активность, то после действия эндонуклеазы линейные молекулы ДНК становятся доступными действию экзонуклеаз. Гидролиз ДНК экзонуклеазами приводит к образованию моно- и олигонуклеотидов, в результате чего наблюдается уменьшение размеров фрагментов нуклеиновых кислот и снижение интенсивности флуоресценции.

Используя метод флуоресценции для сравнения свойств ДНКаз фракции 0.15 и фракции 0.4 из лимфоцитов больных бронхиальной астмой и здоровых доноров, мы подтвердили наличие различий в свойствах этих ферментов при гидролизе субстрата – суперспиральной ДНК. Из рис. 7 следует, что в результате гидролиза суперспиральной ДНК ДНКазой фракции 0.15 сначала идет усиление флуоресценции, что говорит об образовании релаксированной кольцевой ДНК, а затем значительное снижение интенсивности флуоресценции, т. е. ДНКазы или ДНКазы фракции 0.15 способны гидролизовать ДНК формы I

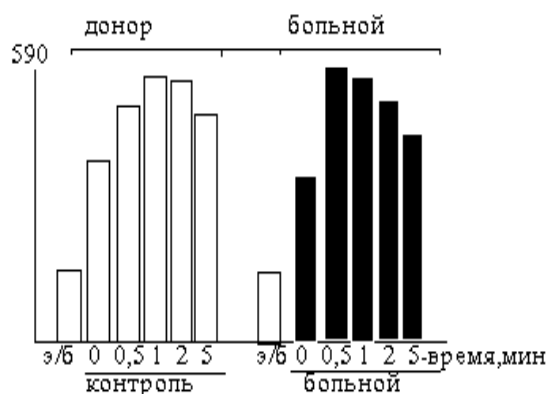


Рис. 7. Кинетика гидролиза суперскрученной ДНК рBR 322 белками хроматина лимфоцитов (фракция 0.15) в зависимости от времени инкубации; э/б – этидиум бромид

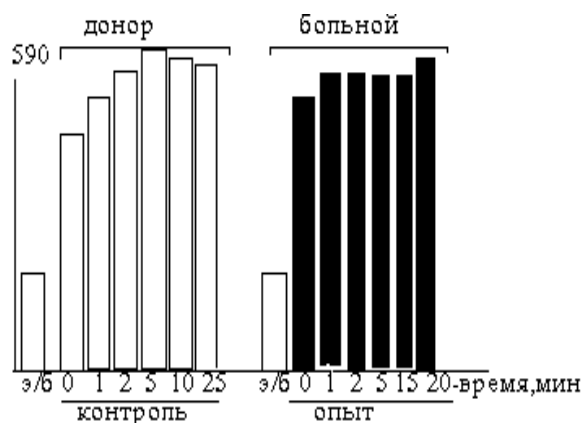


Рис. 8. Кинетика гидролиза суперскрученной ДНК рBR 322 белками хроматина лимфоцитов (фракция 0.4) в зависимости от времени инкубации; э/б – этидиум бромид

не только до релаксированного замкнутого кольца (форма II) и линейной ДНК (форма III), но и более коротких фрагментов молекул, включающих меньшее количество молекул этидиум бромид, чем линейная ДНК (форма III).

Результаты, представленные на рис. 8, подтверждают результаты рис. 6 о том, что ДНКазы фракции 0.4 лимфоцитов больных является эндонуклеазой, которая производит односторонние разрывы, в основном, в денатурированном участке суперспиральных кольцевых молекул ДНК (форма I). Полученные при этом «открытые» кольцевые молекулы ДНК (форма II) устойчивы к действию данного фермента. Как видно из характера диаграммы (рис. 8), ДНКазы лимфоцитов больных и здоровых доноров различаются по скорости гидролиза суперспиральной ДНК и специфичности ко вторичной структуре ДНК, о чем свидетельствует динамика нарастания интенсивности флуоресценции, причем картина образования односторонних разрывов в ДНК белками фракции 0.4 лимфоцитов от здоровых доноров похожа на картину гидролиза суперспиральной ДНК белками фракции 0.15.

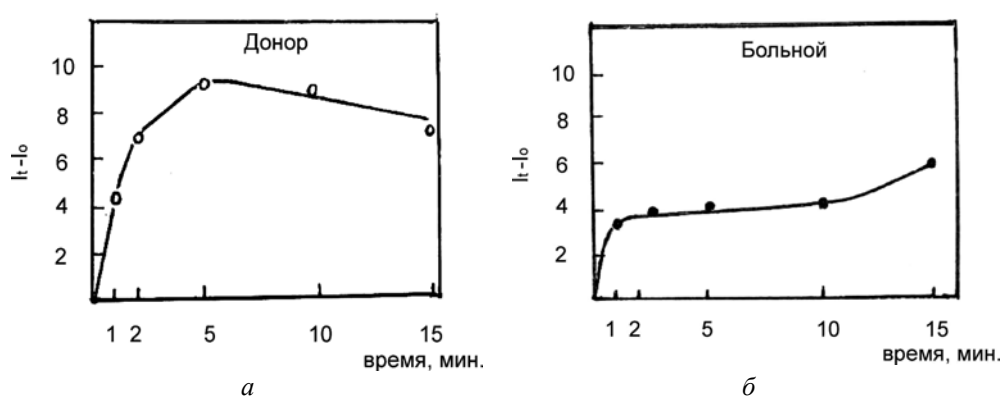


Рис. 9. Кинетика гидролиза ДНК рВР 322 белками хроматина лимфоцитов здоровых доноров (а) и больных (б) бронхиальной астмой (фракция 0.4); где  $I_0$  – интенсивность флуоресценции комплекса ДНК – ДНКазы (момент внесения фермента – 0 мин.);  $I_t$  – интенсивность флуоресценции комплекса ДНК – ДНКазы через время  $t$  (масштаб линейный)

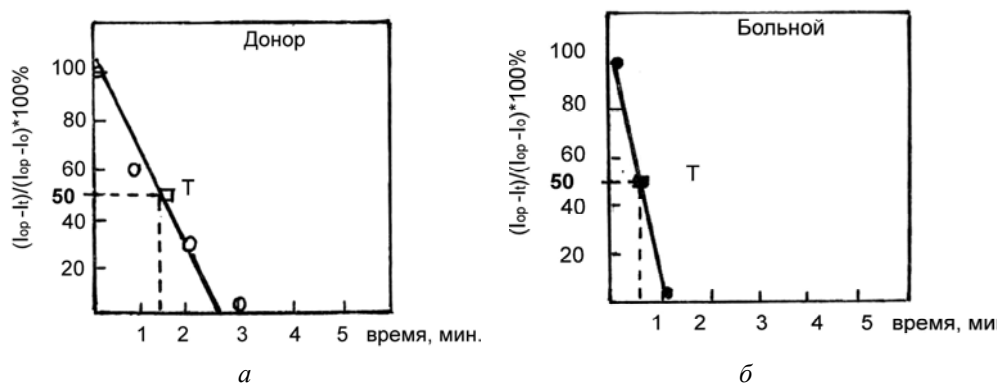


Рис. 10. Определение  $T_{1/2}$  (масштаб полулогарифмический); где  $I_0$  – интенсивность флуоресценции комплекса ДНК – ДНКазы (момент внесения фермента – 0 мин.);  $I_t$  – интенсивность флуоресценции комплекса ДНК – ДНКазы через время  $t$ ;  $I_{op}$  – флуоресценция в условиях, когда все молекулы ДНК открыты;  $T_{1/2}$  – время, в течение которого половина молекул суперспиральной ДНК получила разрывы;  $T_{1/2}$  для реакции ДНК с ДНКазой здорового донора – 1.5 мин. (а),  $T_{1/2}$  для реакции ДНК с ДНКазой больного бронхиальной астмой – 0.5 мин. (б)

Для изучения изменения активности ДНКазы фракции 0.4 (скорости гидролиза субстрата) в зависимости от степени тяжести астмы было отобрано 2 группы доноров по 9 человек. В состав группы больных бронхиальной астмой вошло: 3 человека с легкой степенью заболевания, 3 человека со средней степенью тяжести заболевания и 3 человека с тяжелым течением болезни. Кинетика скорости гидролиза ДНК рВР 322 белками объединенных фракций 0.4 (полученная флуорометрическим методом определения активности эндонуклеаз) представлена на рис. 9. Результаты показали, что в среднем  $T_{1/2}$  больных равно  $53.56 \pm 36.29$  сек., а здоровых доноров равно  $69.17 \pm 34.93$  сек., т. е.  $T_{1/2}$  больных примерно на 23% ниже, чем здоровых. Следовательно, для образования

Табл. 4

Количественная оценка скорости гидролиза ДНК рBR322 (форма I) ДНКазой хроматина суммарной фракции 0.4 больных бронхиальной астмой и здоровых доноров (в сек.)

Кол-во образцов		$T_{1/2}$ больных БА < $T_{1/2}$ здоровых		Кол-во образцов		$T_{1/2}$ больных БА > $T_{1/2}$ здоровых	
1	Тяж.	30	90	1	Лег.	72	52.5
2	ст.	58.5	67.5	2	ст.	140	120
3		16.5	22.5	3		45	30
4	Сред.	45	60				
5	ст.	45	60				
6		30	120				

единичных разрывов в 50% молекул суперспиральной ДНК ДНКазе больных требуется меньше времени, чем ДНКазе клеток здоровых, что говорит о более высокой  $Mn^{2+}$ -зависимой активности в клетках от больных доноров.

Однако среди больных скорость гидролиза ДНК белками-ферментами существенно различалась (табл. 4): в 6 случаях активность ДНКаз больных выше, чем активность здоровых доноров ( $T_{1/2}$  больных БА <  $T_{1/2}$  здоровых), в 3 случаях активность ДНКаз здоровых доноров была выше, чем у больных ( $T_{1/2}$  больных БА >  $T_{1/2}$  здоровых). При этом активность ДНКазы у двух из 9 больных значительно (в 3–4 раза) превышала активность ДНКазы здорового донора. В четырех случаях ДНКазная активность клеток больных превышала активность ДНКаз клеток здоровых доноров на 30–50%, т. е. установлена положительная корреляция между активностью  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы и стадией развития болезни.

Время образования единичных разрывов в 50% молекул ДНК ( $T_{1/2}$ ) больных составило (рис. 10) в среднем 0.5 мин., а здоровых доноров – 1.5 мин.

Таким образом, в клетках лимфоцитов больных выявлены две активности:  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимая и  $Mn^{2+}$ -зависимая ДНКазные активности. Причем в клетках больных выше  $Mn^{2+}$ -зависимая ДНКазная активность, а в клетках здоровых доноров –  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимая ДНКазная активность. Особенно выражены эти отличия во фракции белков, связанных с хроматином.

### 3. Обсуждение

Усилия исследователей при изучении апоптоза позволили в относительно короткий срок (с начала 1990-х гг.) сделать важные открытия при изучении молекулярных механизмов запуска этого процесса [19]. Существенные успехи достигнуты в понимании структуры и функционирования Fas-рецептора и связанных с ним молекул, факторов, контролирующих апоптоз (Вс1-2, Вах и т. д.) и сериновых протеаз (каспаз) [20]. В то же время не установлена природа эндонуклеаз, осуществляющих расщепление ДНК при апоптозе, и не выяснено, каким образом протеолиз, осуществляемый каспазами, приводит к активации этих эндонуклеаз.

Тем не менее роль триггерного механизма, обеспечивающего вступление процесса апоптоза в необратимую стадию, отдают ферменту – эндонуклеазе. Активация эндонуклеазы сопровождается фрагментацией ДНК. Само по себе

это уже неизбежно обеспечивает гибель клетки. Установлено, что активация эндонуклеазы и гибель тимоцитов на раннем этапе зависят от значительного повышения в цитозоле концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , наибольшее количество которого имело внеклеточное происхождение. В работе [21] утверждается, что для лимфоидных клеток характерен Ca-зависимый путь апоптоза, а увеличение кальция – это фактор, провоцирующий апоптоз в тимоцитах [22] и лимфоцитах [21], и эти данные подтверждаются работой [23], в которой на В-лимфоцитах человека показано, что снижение кальция тормозит апоптоз этих клеток.

По данным литературы в апоптотирующих клетках периферической крови, в том числе в Т-лимфоцитах, определяются, как правило, эндонуклеазы, активируемые ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Ядра тимоцитов содержат значительные количества  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, как полагают, этот фермент активируется глюкокортикоидом. Однако в других Т-клетках, подверженных апоптозу, например, в тимоме S49, где происходит фрагментация ДНК при инкубации с дексаметазоном, эндонуклеаза не определялась. Является ли  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза единственным белком [24], синтез которого необходим, или существует множество эндонуклеаз в Т-клетках, необходимых для запуска апоптоза, – не установлено. Таким образом, вопрос об «апоптотических» нуклеазах в клетках периферической крови остается открытым.

Обращает на себя внимание апоптотическая ДНКаз-гамма, обнаруженная и выделенная из ядер тимоцитов крыс. Молекулярная масса фермента – 33 кДа, и для его работы требуются одновременно ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , причем эта потребность частично подавляется ионами  $\text{Mn}^{2+}$  [13].

Учитывая полученные нами экспериментальные данные о снижении в лимфоцитах больных  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой ДНКазной активности, появлении  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой ДНКазной активности и данные литературы о роли свободного кальция в апоптозе лимфоцитов, позволим себе высказать предположение, что причиной устойчивости к апоптозу лимфоцитов больных бронхиальной астмой является снижение концентрации внутриклеточного кальция и увеличение содержания ионов марганца, в результате чего запускается механизм активации  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазной активности. Это ведет к изменению характера фрагментации ДНК лимфоцитов, и, как следствие, идет нарушение процесса образования апоптотических телец, тем самым тормозится апоптоз лимфоцитов у больных бронхиальной астмой.

### Summary

*Z.I. Abramova, M.M.D. Nsangou, V.G. Vinter*. The DNAses of the peripheral blood lymphocytes from patients with bronchial asthma.

We studied the cytoplasmic and nucleic proteins of lymphocytes from healthy donors and patients with bronchial asthma. In the peripheral blood cells of healthy donors undergoing apoptosis, we found a DNase activated by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions. Lymphocytes of patients with bronchial asthma contain DNAses, the activity of which depends on the gravity of the disease. In the cells of the patients the activity of the  $\text{Mn}^{2+}$ -dependent DNase increases, whereas the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent DNase decreases. Taking into consideration the role of the  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent DNase in apoptosis, we can propose that there is a link

between the reduction of the rate of apoptosis of lymphocytes of patients with bronchial asthma and the disfunction of the induction of "apoptotical"  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent nuclease.

### Литература

1. *Новиков В.С.* Программированная клеточная гибель. – СПб.: Наука, 1996. – 286 с.
2. *Белушкина Н.Н., Хасан Хамад Али, Северин С.Е.* Молекулярные основы апоптоза // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. – 1998. – № 4. – С. 15–23.
3. *Яриллин А.А., Никонова М.Ф., Яриллина А.А., и др.* Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки в клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 7–16.
4. *Alles A., Alley K., Barrett J.C. et al.* Apoptosis: a general comment // FASEB J. – 1991. – V. 5, No 8. – P. 2127–2128.
5. *Zhougl L., Sarafian T., Kane D.* Bcl-2 inhibits death of central neuronal cells induced by multiple agents // Proc. Nat Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90. – P. 4533–4537.
6. *Melis M, Siena L, Pace E, Gjomarkaj M, et al.* Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects // Eur Respir J. – 2002 – V. 19, No 2. – P. 257–266.
7. *Green D.R., Scott D.W.* Activation-induced apoptosis in lymphocytes // Curr. Opin. Immunol. – 1994. – V. 6, No 3. – P. 476–487.
8. *Szopa J., Adamiec R.* Is the 65 kDa protein direct signal for the nuclease release from nuclear matrix, starting the apoptotic cascade? // Acta Bioch. Polonica. – 1993. – V. 40, No 2. – P. 209–212.
9. *Deng G., Podac E.R.* Deoxyribonuclease induction in apoptotic cytotoxic T lymphocytes // FASEB J. – 1995. – V. 9, No 8. – P. 665–669.
10. *Enari M., Sakahira H., Yokoyama H. et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD // Nature. – 1998. – V. 391. – P. 43–50.
11. *Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B.A et al.* A role of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by Poly(ADP-ribose) polymerase // J. Biol.Chem. – 2000. – V. 275, No 28. – P. 21302–21308.
12. *Jang C.Y., Lee J.Y., Kim J.* Rps3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis // FEBS Lett. – 2004. – V. 560. – P. 81–85.
13. *Higami Y., To K., Ohtani H. et al.* Involvement of DNase gamma in apoptotic DNA fragmentation in histiocytic necrotizing lymphadenitis // Virchows Arch. – 2003. – V. 443, No 2. – P. 170–174.
14. *Nicoletti I., Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // J. Immunol. Methods. – 1991. – V. 139. – P. 271–279.
15. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
16. *Винтер В.Г.* Нуклеиновые кислоты опухолевых клеток // Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1969. – С. 27.
17. *Беляева М.И., Зоткина Н.Л., Винтер В.Г.* Выделение и некоторые свойства ДНКазы хроматина ядер печени крыс // Биохимия. – 1970. – Т. 35. – С. 409–413.
18. *Винтер В.Г., Зоткина Н.Л., Зо Сын Ха, Абрамова З.И.* Очистка и иммунохимическая характеристика Mn-зависимой ДНКазы хроматина // Биохимия. – 1993. – Т. 58, № 9. – С. 1394–1402.

19. *Yoshida H.* Machinery of programmed cell death // *Nippon Ribsho.* – 2005. – V. 63, No 4. – P. 401–406.
20. *Boulares A.N., Ren T.* Mechanism of acetaminophen-induced apoptosis in cultured cells: roles of caspase-3, DNA fragmentation factor, and the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  endonuclease DNAS1L3 // *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – V. 94, No 1. – P. 19–29.
21. *Oshimi Y., Miyazaki S.* Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level // *J. Immunol.* – 1995. – V. 154, No 2. – P. 599–609.
22. *Beaver J.P., Waring P.* A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes // *Europ. J. Cell. Biol.* – 1995. – V. 68, No 1. – P. 47–54.
23. *Green D.R., Scott D.W.* Activation-induced apoptosis in lymphocytes // *Curr. Opin. Immunol.* – 1994. – V. 6, No 3. – P. 476–487.
24. *King L.B., Vacchio M.S., Ashwell J.D.* To be or not to be: mutually antagonistic deas signals regulate thymocyte apoptosis // *Intern. Arch. Allergy Immunol.* – 1994. – V. 105, No 4. – P. 355–358.

Поступила в редакцию  
16.01.06

---

**Абрамова Зинаида Ивановна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета.

**М.М. Дезире Нсангу** – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.