

ПОПОВА

Ирина Сергеевна

**Влияние рекомбинантного растворимого рецептора  
интерлейкина-5 ( $\alpha$ -цепь) на интерлейкин-5-опосредованные  
эффекты при экспериментальной бронхиальной астме**

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Сибирском государственном медицинском университете Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук

**Сазонов Алексей Эдуардович**

Официальные оппоненты:  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Агафонов Владимир Иванович**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Маслов Леонид Николаевич**

Ведущая организация: НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН  
г. Москва

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Россия, Томск, Московский тр., 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Россия, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Суханова Г.А.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

По данным эпидемиологических исследований бронхиальная астма занимает одно из первых мест в структуре аллергических заболеваний человека. Патогенез аллергического воспаления при бронхиальной астме, как правило, связан с эозинофилией [Lambrecht V.N. et al, 2003]. Иницируя позднюю фазу воспаления, эозинофилы обеспечивают развитие бронхиальной гиперреактивности и ремоделирование бронхов [Kita H. et al, 1998]. К медиаторам, которые влияют на функциональную активность эозинофилов, относится ИЛ-5. Он обладает широким спектром биологических эффектов, играя ключевую роль в дифференцировке, созревании и активации этих клеток [Kay A. V., Menzies-Gow A., 2003; Ogawa et al., 2003].

Эффекты ИЛ-5 на эозинофилы опосредуются через его рецепторный аппарат, который состоит из 2-х субъединиц:  $\alpha$ -субъединицы, отвечающей за специфичное связывание с ИЛ-5, и  $\beta$ -субъединицы, необходимой для внутриклеточного проведения сигнала. Альтернативный сплайсинг  $\alpha$ -субъединицы может приводить к образованию мембраносвязанной или растворимой изоформ, которые опосредуют либо являются антагонистами активности ИЛ-5, соответственно, однако могут связывать ИЛ-5 с достаточно высокой аффинностью [Tavernier 1991, 2000].

Другой ключевой клеткой, задействованной в формировании патологических проявлений бронхиальной астмы, является гладкомышечная клетка дыхательных путей. ИЛ-5 может действовать на гладкие мышцы как опосредованно, через повышение продукции эозинофил-ассоциированных медиаторов воспаления, так и непосредственно. Но его роль в этом процессе не до конца понятна.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в понимании патогенеза бронхиальной астмы, взаимосвязи иммунных механизмов воспаления и манифестации клинических проявлений астмы. Применение традиционной терапии с использованием кортикостероидов эффективно для контроля большинства симптомов астмы, но не позволяет проводить целенаправленную коррекцию функций клеток-эффекторов. В связи с этим большое значение приобретает поиск новых фармакологических стратегий, направленных на регуляцию сложного взаимодействия между клеткой - мишенью и ИЛ-5. Одним из возможных подходов в блокировании эффектов ИЛ-5 является использование растворимой формы рецептора ИЛ-5, которая способна образовывать комплекс с ИЛ-5, тем самым инактивируя его. Таким образом, получение рекомбинантного рецептора и использование его в качестве регулятора эффектов ИЛ-5 является актуальной задачей для решения вопросов разработки новых направлений в терапии бронхиальной астмы.

**Цель:** Установить механизм регуляции ИЛ-5-опосредованных изменений в эозинофилах и гладкомышечных клетках бронхов с использованием рекомбинантного растворимого рецептора ИЛ-5 в экспериментальной модели бронхиальной астмы.

**Задачи:**

1. С использованием морфологических критериев оценить валидность модели бронхиальной астмы на морских свинках.
2. Изучить действие ИЛ-5 на эозинофилы (апоптоз, экспрессию мРНК ИЛ-5 и его рецептора) и гладкомышечные клетки бронхов (сократимость, экспрессию мРНК ИЛ-5 и его рецептора), полученные от интактных животных и животных с экспериментальной бронхиальной астмой.
3. Разработать систему экспрессии, выделения и очистки рекомбинантного растворимого рецептора интерлейкин-5 ( $\alpha$ -цепь).
4. Исследовать влияние рекомбинантного растворимого рецептора ИЛ-5 в отношении эффектов ИЛ-5 на эозинофилы и гладкомышечные клетки бронхов, полученных от интактных животных и животных с экспериментальной бронхиальной астмой.

**Научная новизна**

Впервые *in vitro* установлен механизм действия ИЛ-5 на гладкие мышцы дыхательных путей, основанный на взаимодействии цитокина с его клеточным рецептором и проявляющийся повышением бронхиальной гиперреактивности. Показано, что ИЛ-5 непосредственно не вызывает сокращения гладких мышц, но приводит к гиперреактивности, значительно повышая чувствительность гладких мышц к гистамину. Впервые обнаружено, что в гладких мышцах экспрессируется только мРНК мИЛ-5Р $\alpha$ .

Впервые показано, что сенсibilизация морских свинок овальбумином приводит к угнетению апоптоза эозинофилов периферической крови и увеличению в них уровня мРНК ИЛ-5 и его рецептора.

Впервые осуществлено клонирование полноразмерной кДНК рИЛ-5Р $\alpha$  человека по сайтам рестрикции эндонуклеаз FauNDI и Sfr2741 в экспрессирующую плазмиду. Получен бактериальный штамм, несущий плазмиду рЕТ15b+/рИЛ-5Р $\alpha$ , продуцирующий рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$ .

Доказано, что рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$  блокирует ИЛ-5-опосредованные эффекты в отношении бронхиальной гиперреактивности и антиапоптотического действия на эозинофилы. Рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$  может связывать как эндогенный, так и экзогенный ИЛ-5 по конкурентному механизму.

**Теоретическое и практическое значение работы**

Получены новые данные об участии ИЛ-5 в формировании бронхиальной гиперреактивности по эозинофил-независимому пути. Изучены эффекты ИЛ-5 в отношении активности апоптоза эозинофилов *in vitro*. В результате работы получен штамм E.coli, продуцирующий рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$ . Возможность использования полученного белка в качестве агента, блокирующего эффекты ИЛ-5, обоснована на

экспериментальной модели бронхиальной астмы. Дальнейшее использование разработанной технологии клонирования рекомбинантного белка возможно не только для получения рИЛ-5Р $\alpha$ , но и для получения других рекомбинантных продуктов.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Сенсibilизация морских свинок овалбумином приводит к формированию экспериментальной бронхиальной астмы, которая характеризуется воспалением с развитием эозинофилии ткани легких, повышенным уровнем мРНК ИЛ-5 и его рецептора, снижением активности апоптоза эозинофилов периферической крови, а также повышенной чувствительностью гладких мышц бронхов к гистамину.
2. Культивирование эозинофилов, полученных от интактных животных, с экзогенным ИЛ-5 не влияет на образование мРНК ИЛ-5 и его рецептора в этих клетках. Культивирование эозинофилов, полученных от животных с экспериментальной бронхиальной астмой, приводит к снижению уровня мРНК обеих изоформ рецептора. Культивирование эозинофилов морских свинок с ИЛ-5 вызывает уменьшение числа клеток с морфологическими признаками апоптоза.
3. В эпителизированных фрагментах гладких мышц бронхов морских свинок определяется одновременно мРНК ИЛ-5 и мРНК его рецептора. При экспериментальной бронхиальной астме оба показателя повышены по сравнению с контролем. Деэпителизированные фрагменты характеризуются экспрессией мРНК рецептора ИЛ-5 в контрольной группе, повышенным уровнем мРНК рецептора ИЛ-5 и незначительным уровнем мРНК ИЛ-5 в группе животных с экспериментальной бронхиальной астмой. Гладкие мышцы бронхов характеризуются экспрессией мРНК только мембраносвязанной изоформы рецептора. Экзогенный ИЛ-5 повышает чувствительность гладкомышечных клеток бронхов к гистамину.
4. Клонирование кДНК рецептора ИЛ-5 по сайтам рестрикции FauNDI и Sfr2741 в плазмиду рЕТ15b+ позволяет получить рекомбинантный растворимый рецептор ИЛ-5, соответствующий нативному растворимому рецептору. Инкубация с рекомбинантным рецептором ИЛ-5 блокирует ИЛ-5 опосредованное увеличение жизнеспособности эозинофилов и повышение чувствительности гладких мышц бронхов к гистамину.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены на международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (г. Томск, 2003, 2004); на Европейском респираторном конгрессе (г. Вена, 2003, г. Копенгаген, 2005); на конкурсе молодых ученых СибГМУ (г. Томск, 2004); на Всероссийском конгрессе «Фундаментальные науки – медицине» (г. Новосибирск, 2005); на проблемной комиссии по патофизиологии; на кафедральном совещании патофизиологии (Томск, 2006).

#### **Внедрение результатов исследований**

Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедрах биофизики, биохимии и патофизиологии Сибирского государственного

медицинского университета. Методы молекулярного клонирования и RT-ПЦР адаптированы и внедрены в практику научных исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 7 – в журналах рекомендованных... ВАК РФ.

### **Объем и структура диссертации**

Работа изложена на 158 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы собственных результатов и выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 8 таблицами. Список источников цитируемой литературы включает в себя 195 работы, из которых 19 отечественных и 176 - зарубежных авторов.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Объекты исследования**

Работа выполнена на 24 (14 – опытных и 10 – контрольных) морских свинок весом 200-400 г. Животных опытной группы сенсibilизировали трехкратно подкожными инъекциями 0,25% взвеси овальбумина (0,1 мл препарата на 100 г веса животного). Промежуток между инъекциями составил 3-4 дня. На 21-й день животных ингалировали овальбумином. Ингаляции выполняли в течение 30 минут ультразвуковым небулайзером “Муссон-1М” (средний размер дисперсных частиц до 5 мкм, производительность распыления не менее 0,4 мл/мин). Спустя несколько минут после начала ингаляции, у животных появлялась экспираторная одышка, кашель, чихание. Затруднение дыхания нарастало в течение 3-5 мин. После окончания ингаляции животных умерщвляли без применения наркоза методом цервикальной дислокации, вскрывали грудную клетку, выделяли легкие, отделяли трахею и главные бронхи. Для исследования использовали:

- Гистологический материал главного бронха, среднедолевого бронха и мелких бронхиол с участками легочной паренхимы, параллельно готовили кольцевые сегменты бронхов длиной 2-3 мм;
- Эозинофилы периферической крови морских свинок;
- Бактериальные штаммы E.coli – XL1-Blue и BL-21(DE3);
- Плазмидные векторы: pBLSK SK(+), pET15b(+).

### **Выделение тотальной РНК**

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках «QIAGEN RNA/DNA» (QIAGEN, Германия). Принцип метода основан на связывании РНК с сорбентом с последующей ее элиминацией специальным буфером.

### **Аmplификация РНК в RT-ПЦР**

RT-ПЦР проводили набором «Titan One Tube RT-PCR System» (Roche Diagnostics GmbH, Германия) согласно приложенной инструкции. Использование данного набора позволяет проведение реакции обратной

транскрипции с мРНК и амплификации кДНК в одной пробирке. Реакция основана на принципе совместного использования AMV ревертазы и Taq-полимеразы. кДНК амплифицировали с помощью праймеров для рИЛ-5Р $\alpha$ : R5U-5'-GTTGAATTCATATGGACTTACTTCCSTGATGAAAAG-3'; R5R-5'-GTAGAAGCTTCTTGAGAACCCACATA-3', R51-5'-TGGTCGGAACAAGAGGATCG-3'; R52-5'-AATCTGCTATCCSTGCTGTTG-3'; R53-5'-GGGAGAAACCAGTGTCTGCTT-3'; (праймеры синтезированы на ДНК-синтезаторе «Биосет», г.Новосибирск). Детекцию продуктов амплификации проводили в 6-8% ПААГ или в 1,5% агарозном гелях.

### **Реакция рестрикции ДНК**

В основе реакции лежит гидролиз ДНК при определенных условиях с соответствующим ферментом рестрикции.

### **Лигирование векторной и ПЦР - амплифицированной ДНК**

Реакция основана на сшивании рестрицированных фрагментов ДНК при помощи фермента ДНК лигазы фага T<sub>4</sub> при определенных условиях.

### **Трансформация E.coli плазмидной ДНК**

Метод основан на том, что обработка E.coli на холоде (0<sup>0</sup>C) раствором CaCl<sub>2</sub> с последующим тепловым шоком (+37<sup>0</sup>C) индуцирует у них состояние «компетентности», когда они могут поглощать молекулы ДНК плазмиды.

### **Микровыделение плазмидной ДНК**

Метод щелочного лизиса клеток.

### **Метод секвенирования ДНК по Максаму – Гилберту**

Метод, основанный на химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца. Препарат меченой ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. В итоге получали полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в ПААГ позволял восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

### **Выделение белка на Ni NTA агарозе**

Вектор экспрессирует встроенную ДНК таким образом, что на N-конце рекомбинантного белка содержится шесть гистидинов, которые являются аффинной мишенью для хроматографической очистки на металл-хелатном сорбенте Ni-NTA. Принцип метода заключается в том, что три ацетатных остатка и один атом никеля образуют структуру, которая в присутствии сильной соли прочно взаимодействует с кольцом гистидина. Промывка слабой солью приводит к ослаблению связи и выделению белка.

### **Получение эозинофилов из периферической крови**

Выделение эозинофилов проводили на трех градиентах плотности фиколла и 35% урографина: 1,082, 1,092 и 1,115 г/см<sup>3</sup>. Клетки над указанными градиентами собирали в центрифужную пробирку и дважды отмывали раствором Хенкса.

### **Оценка жизнеспособности клеток (с трипановым синим)**

Количество эозинофилов в суспензии и их жизнеспособность определяли с использованием 1% раствора трипанового синего. Подсчет клеток производили в камере Горяева по формуле  $X=K*A*104$ , где K-

разведение, А-количество клеток в 25 больших квадратах камеры. В присутствии трипанового синего окрашивались только погибшие клетки.

#### **Цитоморфологический анализ апоптотической гибели клеток**

Мазки, приготовленные из клеточной суспензии, окрашивали по Нохту-Максимову. Морфологический анализ апоптотической гибели проводили на микроскопе «БИОЛАМ» (Россия) при увеличении об.90 х ок.10. При анализе использовали критерии, характеризующие кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках. Подсчитывали 200 клеток.

#### **Метод индукции и ингибирования апоптотической гибели клеток**

Эозинофилы суспендировали в среде №199 (150 мкл), содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку и 100 ЕД/мл пенициллина. После определения клеточности и жизнеспособности помещали в планшеты и инкубировали при 37°C. Мазки готовили через 6 ч, 12 ч, 24 ч культивирования. Ингибировали апоптоз ИЛ-5, восстанавливали апоптоз рекомбинантным рИЛ-5Р. Клетки инкубировали с ИЛ-5 (0,1 мкг/мл), либо одновременно с ИЛ-5 (0,1 мкг/мл) и рекомбинантным рИЛ-5Р (0,1 мкг/мл).

#### **Гистологическое исследование слизистой оболочки бронхиальной стенки морских свинок**

Материал слизистой оболочки бронхов фиксировали в 10-12% нейтральном растворе формалина при 18-20<sup>0</sup> в течение 24 - 48 часов, промывали в проточной воде в течение 24 часов, после чего обезживали в спиртах возрастающей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96%, абс I, абс II). Далее материал заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5-7 мкм.

Для осуществления обзорной микроскопии проводили окраску препаратов гематоксилином-эозином. Принцип метода заключается в том, что ядра клеток воспринимают основной краситель гематоксин, а цитоплазма кислый – эозин.

Для исследования коллагеновых волокон соединительной ткани срезы окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону. Принцип метода заключается в том, что коллагеновые волокна воспринимают пикрофуксин и окрашиваются в ярко розовый цвет, а ядра клеток в черный цвет.

Исследование морфологии тканевых базофилов и эозинофилов проводили сочетанной окраской срезов основным коричневым и прочным зеленым. Принцип метода заключается в том, что в основной среде катионные белки эозинофилов способны образовывать стойкие соединения с прочным зеленым, окрашиваясь в темно-зеленый цвет, а гранулы тучных клеток с основным коричневым с формированием темно-желтых гранул.

Микрофотографирование препаратов осуществляли цифровым фотоаппаратом (LDC Digital camera QV-100 фирмы Casio).

#### **Морфометрическое исследование слизистой оболочки бронхов**

При обзорной световой микроскопии при увеличении в 200 раз оценивали патологические изменения в слизистой оболочке бронхов. Количественный подсчет морфометрических параметров проводили с использованием графического редактора Adobe PhotoShop 5.5.

Подсчет объемной плотности исследуемых параметров осуществляли при увеличении 400 методом точечного счета с использованием сетки Автандилова. При увеличении 1500 учитывали плотность клеточного инфильтрата в собственной пластинке слизистой путем количественного подсчета нейтрофилов, лимфоцитов, плазмоцитов в 1 мм<sup>2</sup>. В популяциях тканевых базофилов и эозинофилов определяли количество недегранулированных и дегранулированных клеток.

### **Исследование сократительной активности гладких мышц бронхов морских свинок**

Исследование сократимости гладкомышечных сегментов проводили с помощью метода механографии в условиях, близких к изометрическим. В процессе исследования использовали тестирующие растворы: гистамин (0,01 нМ – 100 мкМ) (России), рекомбинантный ИЛ-5 (0,1 мкг/мл) (Sigma, США), рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$  (0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл). Эффекты гистамина оценивали в % от амплитуды контрольного сокращения сегментов, принимаемой за 100%, на стандартную концентрацию КС1 (40 мМ). По результатам тестирования строили кривые “доза-эффект”.

#### **Анализ экспрессии мРНК ИЛ-5 и его рИЛ-5Р $\alpha$**

Для оценки экспрессии мРНК ИЛ-5 и изоформ его рецептора на гладких мышцах бронхов и на эозинофилах периферической крови морских свинок использовали RT-ПЦР. Для этого выделяли тотальную РНК и проводили обратную транскрипцию для получения кДНК. кДНК амплифицировали с праймерами для: ИЛ-5: 5' – GCT TTC TAC TCA TCG AAC TCT GC – 3'; 3' – CTT GCA GGT AAT CCA GGA ACT GC – 5';  $\alpha$ -формы рецептора ИЛ-5: 5' – TTA CCG AAT TTG GGC – 3'; 5' – GGA TTT TTT CCG GGA AC – 3'; ГАФДГ: 5' – ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG – 3'; 3' – AGG TAC GAT CCA CAA CCG AC – 5'

ПЦР выполняли набором АмплиСенс-200. Амплификат разгоняли на 2% агарозном геле и анализировали с использованием видеосистемы и программного обеспечения “Biotest D”. Экспрессию мРНК оценивали полуколичественно в сравнении с экспрессией мРНК ГАФДГ, которую принимали за 100 %.

#### **Статистическая обработка результатов**

Математические расчеты проводили с помощью пакета программ “Statistica for Windows 5.0”. Вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (s). Так как распределение полученных цифровых данных не соответствовало нормальному, использовали непараметрический U-критерий Манн-Уитни для независимых совокупностей. Изменения считались значимыми при достоверности  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Моделирование бронхиальной астмы на морских свинках и оценка биологических эффектов ИЛ-5**

Для получения экспериментальной БА животные сенсibilизированы овальбумином. Для оценки адекватности полученной модели изучены

морфологическое и функциональное состояние слизистой оболочки бронхов. Исследование показало однонаправленность изменений гистологической картины у морских свинок после моделирования астматического приступа и у больных атопической БА. Это позволило использовать данную модель в дальнейших экспериментах.

### **Характеристика экспрессии мРНК ИЛ-5 и его рецептора ( $\alpha$ -субъединицы) на эозинофилах периферической крови морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой**

На эозинофилах периферической крови, полученных от интактных животных и животных с моделью БА, проведена оценка уровня экспрессии мРНК ИЛ-5 и изоформ его рецептора, мИЛ-5R $\alpha$  и рИЛ-5R $\alpha$  (табл. 1). Установлено, что во всех исследуемых случаях обнаружена повышенная экспрессия мРНК как самого ИЛ-5, так и обеих изоформ его рецептора, которая превышала контрольные значения приблизительно в 2 раза. Кроме того, наблюдалась повышенная экспрессия мембраносвязанной изоформы рецептора по отношению к экспрессии растворимой. К интересным результатам приводило последующее культивирование эозинофилов, полученных от животных обеих групп с ИЛ-5. Культивирование практически не приводило к изменению исследуемых параметров в контрольной группе, тогда как при экспериментальной БА происходило снижение уровня экспрессии мРНК обеих изоформ рецептора до контрольных значений.

Таблица 1

Уровень мРНК ИЛ-5, мембраносвязанной и растворимой изоформ рецептора ИЛ-5 в эозинофилах периферической крови контрольных животных и животных с экспериментальной бронхиальной астмой, (M $\pm$ m)

Показатели	Группа с экспериментальной БА (n=14)	Контрольная группа (n=10)
мРНК ИЛ-5, %	34,3 $\pm$ 3,5 p<0,05	16,1 $\pm$ 1,2
мИЛ-5R $\alpha$ , %	17,7 $\pm$ 3,9 p<0,05	7,9 $\pm$ 1,1
рИЛ-5R $\alpha$ , %	9,9 $\pm$ 2,4 p<0,05	4,3 $\pm$ 0,8

Примечание: n – количество животных, p – достоверность различий при сравнении опытной и контрольной группы (p<0,05).

### **Влияние ИЛ-5 на апоптоз клеточной культуры эозинофилов периферической крови морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой**

Проанализированы морфологические изменения в эозинофилах на протяжении 24 ч инкубации в среде, содержащей ИЛ-5. Морфологический анализ проведен с использованием критериев, характеризующих

кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках при апоптозе.

При исследовании эозинофилов, полученных из крови животных опытной группы, установлено значительное снижение количества клеток с морфологическими признаками апоптоза по сравнению с группой интактных животных (рис. 1).



Рис. 1. Содержание эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза (в %) в течение 24 ч культивирования. \*-  $p < 0,01$ ; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в группе контроля.

Действительно, клетки, полученные из крови сенсibilизированных животных, в меньшей степени подвержены апоптозу, чем эозинофилы, полученные от контрольных животных. Можно предположить, что уменьшение признаков апоптоза и, соответственно, увеличение продолжительности жизни этих клеток может быть ассоциировано с ИЛ-5-опосредованными эффектами.

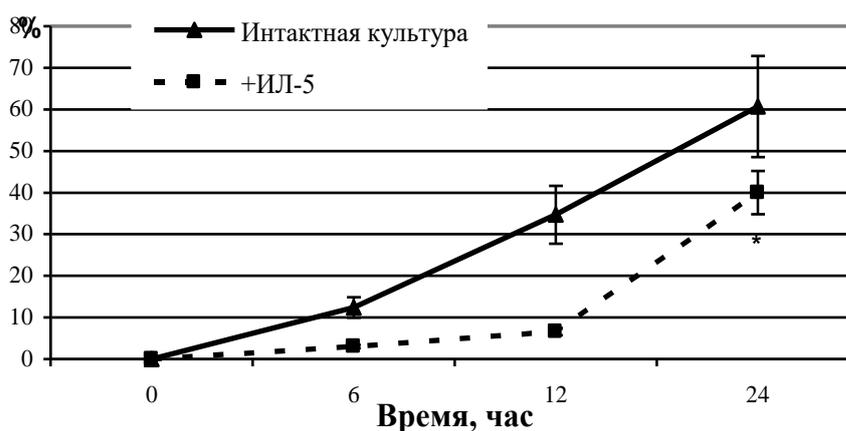


Рис. 2. Содержание эозинофилов периферической крови контрольных животных с морфологическими признаками апоптоза (в %) в течение 24 ч культивирования с интерлейкином-5 (+ИЛ-5); \* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в интактной культуре эозинофилов.

В группе контрольных животных при добавлении в культуру эозинофилов экзогенного ИЛ-5 наблюдалось значительное снижение апоптотической активности этих клеток по сравнению с интактной культурой (рис. 2). Причем наиболее выраженные изменения наблюдались через 12 ч и 24 ч инкубирования.

Исследования, проведенные на культуре эозинофилов, полученной от животных с экспериментальной БА, давали сходные результаты, однако, значения исследуемого параметра превышали соответствующие данные в группе контрольных животных примерно в 1,5 раза (рис. 3).

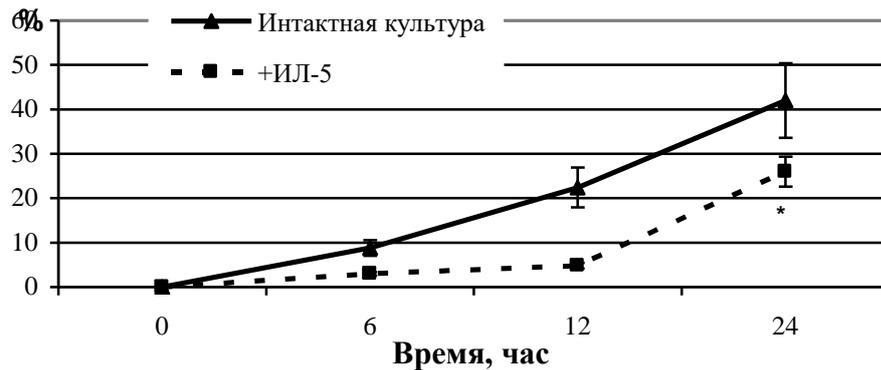


Рис. 3. Содержание эозинофилов периферической крови животных с бронхиальной астмой с морфологическими признаками апоптоза (в %) в течение 24 ч культивирования с интерлейкином-5 (ИЛ-5); \* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в интактной культуре эозинофилов.

Действие ИЛ-5 на эозинофилы приводило к еще большему снижению числа клеток с признаками апоптоза на протяжении всего 24-х часового периода инкубации.

Полученные данные показали, что как в культуре эозинофилов, полученных из крови животных с экспериментальной БА, так и контрольных животных на фоне низких показателей апоптотической гибели в интактной культуре, добавление ИЛ-5 вызывало значительные изменения в эозинофилах в сторону уменьшения числа клеток с морфологическими признаками апоптоза (рис. 2, 3).

#### **Изучение эффектов действия гистамина, ИЛ-5 на сократительную активность гладкомышечных клеток бронхов морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой**

В данном блоке работы проведена оценка влияния ИЛ-5 на сократительную активность гладких мышц бронхов морских свинок с экспериментальной БА. Для этого препараты гладкомышечных сегментов трахеи и главных бронхов животных контрольной и экспериментальной групп подвергнуты влиянию гистамина на фоне действия ИЛ-5.

В первой серии экспериментов изучено влияние гистамина в концентрациях от  $10^{-4}$ М до  $10^{-11}$ М на механическое напряжение деэпителизированных гладкомышечных сегментов трахеи и главных бронхов

и установлено, что гистамин вызывал дозозависимое сокращение гладких мышц, полученных от животных обеих групп. У сенсibilизированных животных отмечалось более выраженное развитие гиперреактивности гладких мышц на воздействие гистамина по сравнению с группой интактных животных, что проявлялось в значительном снижении пороговых концентраций и увеличении максимальной амплитуды сокращения.

В дальнейшем проведена оценка влияния экзогенного ИЛ-5 на сократительную активность гладких мышц как в контрольной, так и в экспериментальной группах. Для этого ИЛ-5 в различных концентрациях добавляли в кювету с сегментами, но изменения тонуса гладких мышц ни в одном случае не было обнаружено.

Однако, предварительная инкубация изолированных сегментов в течение 24-х ч в среде, содержащей ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл, приводила к значительному повышению сократительной реакции гладких мышц бронхов в ответ на действие гистамина. Данный эффект отмечен как в группе животных с экспериментальной БА, так и в группе контрольных животных (рис.4).

При наибольшей концентрации гистамина ( $10^{-4}$ М) максимальная амплитуда сокращения препаратов гладких мышц, полученных от животных с экспериментальной БА и животных контрольной группы, инкубированных с ИЛ-5, составляла  $115,19 \pm 6,23\%$  и  $98,37 \pm 6,45\%$ , соответственно. То есть гистамин, как и в предыдущих экспериментах, вызывал дозозависимое сокращение гладких мышц, но проинкубированных с ИЛ-5 в большей степени, чем не инкубированных сегментов. Полученные результаты дают основание предположить, что ИЛ-5 оказывает непосредственное влияние на функциональное состояние гладкомышечных клеток бронхов, вероятно через соответствующие рецепторы на поверхности этих клеток.



Рис. 4. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов трахеи и бронхов морских свинок (после их инкубации с ИЛ-5) от lg концентрации гистамина. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

### Характеристика экспрессии мРНК ИЛ-5 и его рецептора ( $\alpha$ -субъединицы) на гладких мышцах бронхов морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой

Для подтверждения этого предположения оценена способность гладких мышц бронхов экспрессировать мРНК ИЛ-5 и его рецепторного комплекса, мембраносвязанной и растворимой изоформ (табл. 2). Оказалось, что в эпителизированных гладкомышечных препаратах бронхов как сенсibilизированных, так и несенсibilизированных животных присутствует мРНК ИЛ-5. При этом значения, выявленные в опытной группе, превышали показатели контрольной группы почти в 6 раз. Дезэпителизация существенно повлияла на экспрессию мРНК ИЛ-5. Так незначительное ее количество было обнаружено только после моделирования астматического приступа (табл. 2). Эти результаты подтверждают многочисленные данные литературы о том, что эпителиальные клетки являются продуцентами различных цитокинов, в том числе и ИЛ-5 [S. Ying et al., 1995].

Таблица 2

Уровень мРНК ИЛ-5, мембраносвязанной и растворимой изоформ рецептора в гладких мышцах в эпителизированных и дезэпителизированных гладкомышечных сегментах бронхов ( $M \pm m$ )

Эпителизированные сегменты	мРНК ИЛ-5, %	мРНК мИЛ-5Р, %	мРНК рИЛ-5Р, %
Контрольная группа (n=10)	6,1 ± 1,2 $p^2 < 0,05$	17,9 ± 1,1	--
Группа с экспериментальной БА (n=14)	34,3 ± 3,5 $p^1 < 0,05$ $p^2 < 0,05$	25,7 ± 3,9 $p^1 < 0,05$	--
Дезэпителизированные сегменты	мРНК ИЛ-5, %	мРНК мИЛ-5Р, %	мРНК рИЛ-5Р, %
Контрольная группа (n=10)	--	15,6 ± 4,4	--
Группа с экспериментальной БА (n=14)	9,3 ± 2,4 $p^1 < 0,05$	29,4 ± 5,2 $p^1 < 0,05$	--

Примечание: n – количество животных,  $p^1$  – достоверность различий при сравнении контрольной и опытной групп;  $p^2$  – при сравнении эпителизированных и дезэпителизированных сегментов

Степень экспрессии мРНК мИЛ-5Р $\alpha$  в контрольной и экспериментальной группах отличалась незначительно, однако, отмечалась тенденция к повышению этого показателя в группе сенсibilизированных животных. Наличие или отсутствие эпителия не оказывало существенного

влияния на изменение количества мРНК, это свидетельствовало о том, что экспрессия рецептора в данном случае происходит исключительно на гладкомышечных клетках. мРНК рИЛ-5Р $\alpha$  ни в одном из вариантов не обнаружена (табл. 2). Вероятно эндогенный регуляторный механизм эффектов ИЛ-5, основанный на повышенной продукции рИЛ-5Р $\alpha$  и характерный для эозинофилов, не работает в системе гладкомышечных клеток, либо экспрессия мРНК этой изоформы столь мала, что ее не удается зафиксировать данным методом.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно предположить, что развитие ИЛ-5-опосредованной гиперчувствительности гладких мышц бронхов происходит, благодаря наличию на их поверхности соответствующих рецепторов к ИЛ-5.

### **Получение рекомбинантной растворимой формы рецептора ИЛ-5**

Значимый фрагмент мРНК рИЛ-5Р $\alpha$  определен с помощью анализа сиквенсов мРНК рецептора ИЛ-5, существующих в базе данных NCBI [<http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=34&c=Gene&l=IL5R>]. В результате выбран фрагмент длиной 964 п.н. Для выявления этого фрагмента подобраны специфические праймеры. При синтезе праймеров учитывалась необходимость введения сайтов рестрикции в исследуемый фрагмент для последующего клонирования в экспрессирующий и клонирующий векторы. В «верхний» праймер были введены сайты рестрикции для эндонуклеаз EcoRI и FauNDI, в «нижний» праймер – для HindIII.

Альтернативный сплайсинг мРНК  $\alpha$ -субъединицы рецептора ИЛ-5 может приводить к образованию мембраносвязанной и двух субтипов растворимой (P1 и P2) изоформ рецептора [Tuypens et al. 1992, Tavernier et al. 1992]. Мембраносвязанная и растворимая изоформы отличаются по наличию или отсутствию трансмембранного домена в структуре рецептора [Tavernier et al. 1992, Devos et al. 1993, Koike et al. 1994]. Мембраносвязанная изоформа рецептора имеет длину 420 а.к.о. Субтип P1 растворимой изоформы отличается от мембраносвянанной тем, что три аминокислотных остатка, а именно, NDE в положениях 333, 334, 335 заменены на FSR, и последовательность от 336 до 420 а.к.о. отсутствует. В субтипе P2 растворимой изоформы аминокислотный остаток N в положении 333 заменен на K, и начиная с 334 а.к.о. последовательность также отсутствует. Поскольку интерес представляли растворимые изоформы рецептора, а они различались между собой только по трем последним аминокислотам, то подбор праймеров осуществлен таким образом, чтобы они были универсальными как для P1, так и для P2.

Поскольку ген рецептора имеет сложную интрон – экзонную структуру, синтез кДНК этого белка проведен с мРНК в системе обратной транскрипции. В дальнейшем подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР рИЛ-5Р $\alpha$  на суммарных кДНК человека.

## Подготовка вектора и фрагмента для клонирования, лигирование, трансформация в *E. coli*

Полученный в ходе многочисленных реакций фрагмент кДНК рИЛ-5Р $\alpha$  клонирован в плазмидный вектор рBLSK по сайтам рестрикции *EcoRI* и *HindIII* с необходимой нам рамкой считывания. После гидролиза ферментами липкие концы вектора и клонируемого фрагмента сшивали с помощью ДНК-лигазы, в результате образовывалась гибридная плазмидная молекула (рис.5).

Лигазной смесью трансформировали *E. coli*, после чего клетки высевали на твердую питательную среду LB с ампициллином, ИПТГ и X-gal. В результате трансформации образовывались различные клоны клеток.

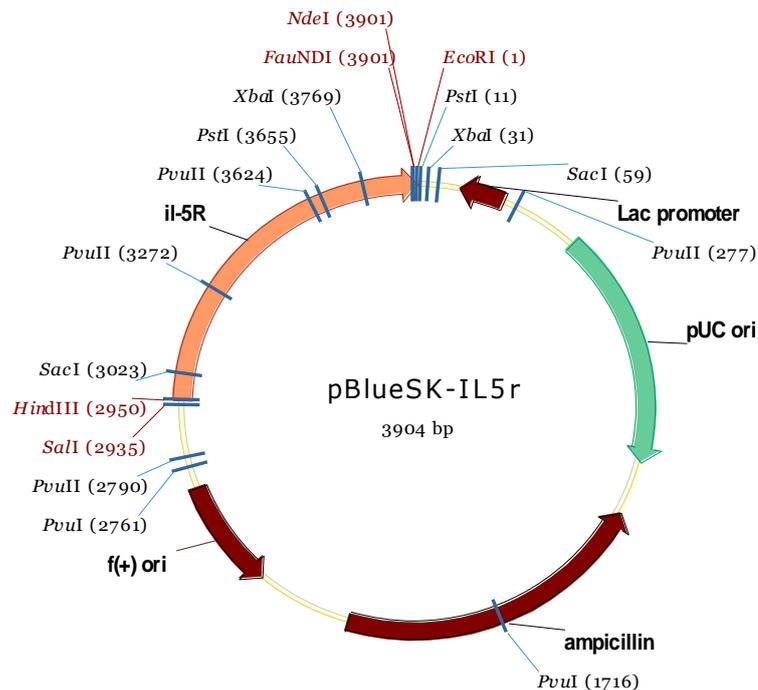


Рис.5. Схема гибридной молекулы рBLSK-рИЛ-5Р. Ori – участок начала репликации плазмиды; ampicillin - ген, кодирующий устойчивость к ампицилину; il-5R – фрагмент, кодирующий растворимый рецептор к ИЛ-5.

### Отбор клонов, содержащих целевую плазмиду рBLSK-рИЛ-5Р $\alpha$

После трансформации отбирали те колонии *E. coli*, которые содержали клетки с плазмидой рBLSK-рИЛ-5Р $\alpha$ . Далее был проведен скрининг случайно отобранных изолированно растущих колоний. Рестрикционным анализом подтверждено наличие сайтов клонирования для эндонуклеаз *HindIII* и *EcoRI*. Кроме того, специфичность продукта подтверждена рестрикцией ферментом *PvuII*, сайты для которого находятся как в самой плазмиде, так и в клонируемом фрагменте рИЛ-5Р $\alpha$ .

Для подтверждения правильности полученного фрагмента первичная структура вставки была секвенирована. В процессе анализа полученных секвенированных последовательностей рИЛ-5Р $\alpha$ , отобран клон, содержащий наименьшее количество нуклеотидных замен.

### Клонирование фрагмента рИЛ-5Р $\alpha$ в экспрессирующий плазмидный вектор рЕТ15b

В связи с тем, что рBLSK является клонирующим вектором, непригодным для продукции белка, исследуемый фрагмент переклонирован в экспрессирующую плазмиду рЕТ15b+ по сайтам рестрикции FauNDI и Sfr2741 (в фрагменте рИЛ-5Р $\alpha$  по сайтам FauNDI и Sall), которые предварительно введены в структуру праймеров.

Бактериальные клоны скринированы на наличие специфической вставки рИЛ-5Р $\alpha$ , для чего сначала проведена амплификация с праймерами на нативную плазмиду рЕТ15b и амплификация со специфическими праймерами R5U/R5R на рИЛ-5Р $\alpha$ . Далее положительные клоны подвергали рестрикции с использованием эндонуклеаз PvuII и PstI, для которых в гибридной плазмиде рЕТ15b-рИЛ5-Р $\alpha$  существуют сайты рестрикции как в самой плазмиде, так и в клонируемом фрагменте.

### Получение рекомбинантного белка рИЛ-5Р $\alpha$

Клетки *E.coli*, трансформированные рЕТ15b-рИЛ-5Р $\alpha$  и индуцированные ИПТГ, синтезировали гибридный белок рИЛ-5Р $\alpha$ . Продукцию белка оценивали с помощью SDS-электрофореза и иммуноблоттинга. Mr гибридного полипептида составляла 36 кДа, что соответствовало ожидаемой (рис.6). Индукция экспрессии белка по рекомбинантному гену являлась еще одним подтверждением встройки гена рИЛ-5Р $\alpha$  в плазмиду в правильной ориентации. Рекомбинантный белок в иммуноблоттинге взаимодействовал с человеческими поликлональными антителами. Таким образом, было показано, что полученные рекомбинантные штаммы *E.coli* продуцировали целевой белок рИЛ-5Р $\alpha$ .

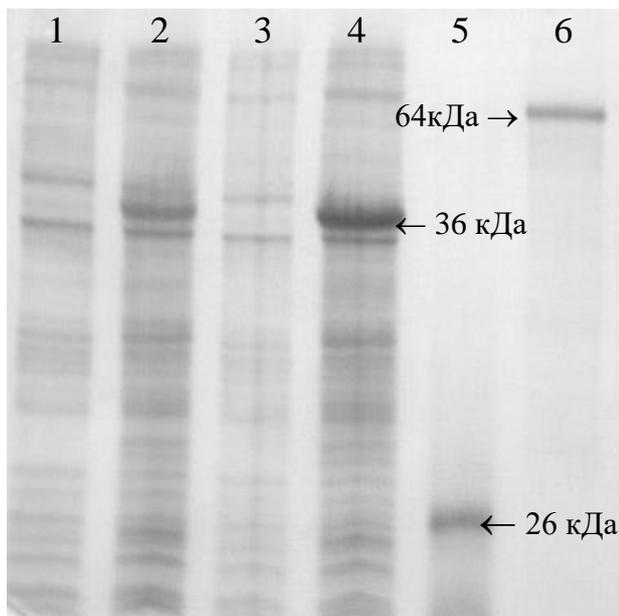


Рис. 6. Анализ экспрессии гена рИЛ-5Р $\alpha$  клеточных лизатов в 15% SDS полиакриламидном геле: 1,3 – лизат клеток *E.coli* BL 21; 2,4 – лизат клеток *E.coli* BL 21, содержащих плазмиду рЕТ15b-рИЛ-5Р $\alpha$ ; 5 – маркер (бычий сывороточный альбумин); 6 – маркер (РНКаза).

Полученный белок был очищен из клеточного лизата при помощи аффинной хроматографии на металл-хелатном сорбенте Ni-NTA (нитрило-три-ацетат), при этом уровень очистки составил более 95%.

#### Оценка биологических эффектов рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$ на модели аллергического воспаления

Для оценки эффектов рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$  в отношении блокирования действия ИЛ-5 с целью дальнейшего изучения возможности применения его в рамках основных подходов к анти-ИЛ-5 терапии проведено исследование полученного белка на культуре эозинофилов и гладкомышечных препаратах, полученных от животных с моделью БА.

#### Оценка биологических эффектов рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$ на эозинофилы периферической крови морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой

Для установления возможного анти-ИЛ-5-блокирующего эффекта рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$  эозинофилы культивированы в присутствии ИЛ-5 и его рекомбинантного рецептора одновременно (рис.7 А, Б).

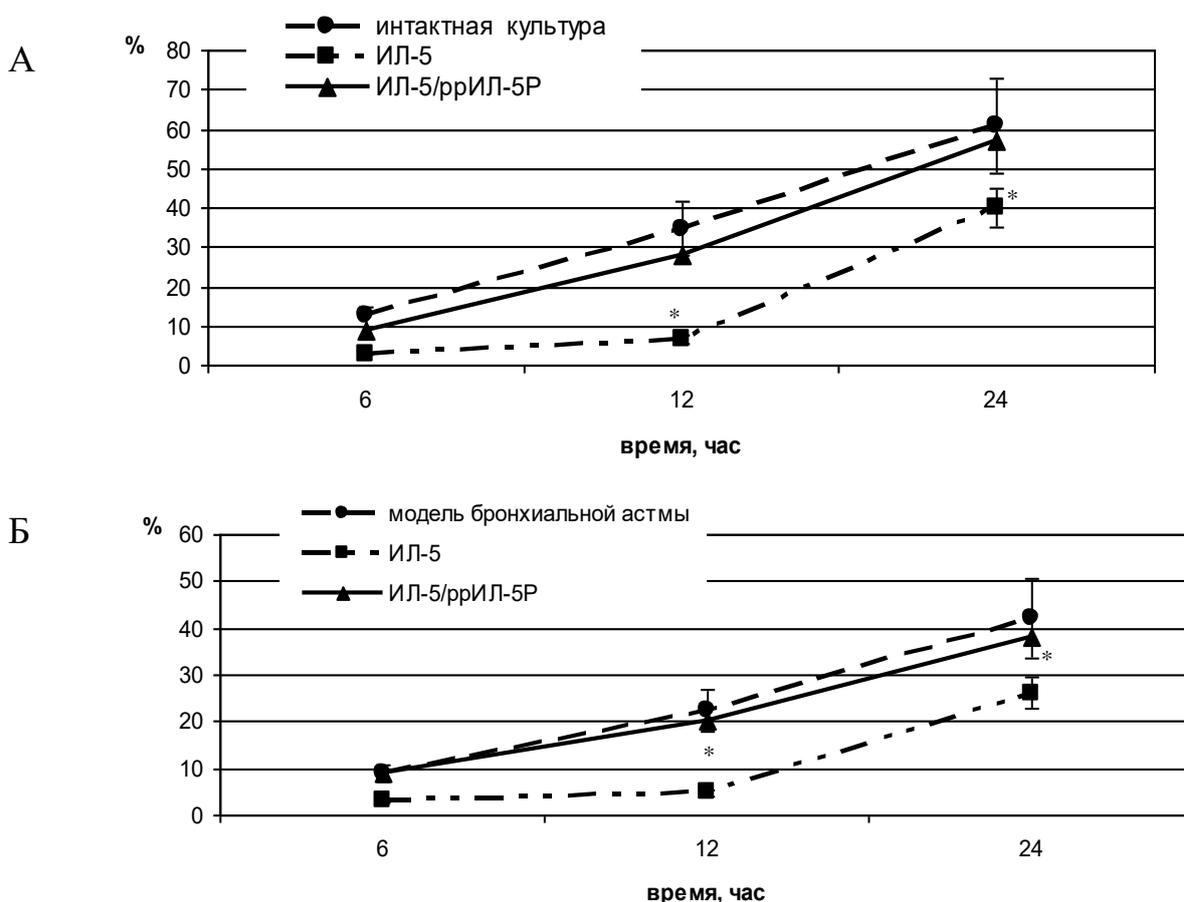


Рис. 7. Содержание эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза (в %) в течение 24 ч инкубации с интерлейкином-5 (ИЛ-5); рекомбинантным рецептором интерлейкина-5 и интерлейкином-5 (ИЛ-5/рИЛ-5Р $\alpha$ ). А. контрольные животные; Б. животные с моделью бронхиальной астмы; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в культуре эозинофилов, инкубированных с ИЛ-5.

Ранее показано, что ИЛ-5 обладает антиапоптотическим действием в отношении эозинофилов. Добавление в культуру одновременно ИЛ-5 и рекомбинантного рецептора приводило к восстановлению апоптотической активности эозинофилов периферической крови морских свинок контрольной группы (рис. 7А). Возможно рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$ , действуя на эозинофилы *in vitro*, конкурирует с нативным клеточным рецептором за связывание ИЛ-5 таким образом, что не происходит связывание ИЛ-5 с его рецептором на поверхности клетки. Это приводит к нарушению трансдукции специфического сигнала внутрь клетки, и как следствие блокируется антиапоптотическое действие, опосредованное ИЛ-5.

Действие ИЛ-5 на эозинофилы, полученные от морских свинок с моделью БА, приводило к еще большему снижению числа клеток с признаками апоптоза на протяжении всего периода инкубации (рис. 7Б). Добавление рекомбинантного рецептора препятствовало этому процессу, что проявлялось восстановлением апоптотической активности клеток.

Таким образом, можно предположить, что рИЛ-5Р $\alpha$  может быть использован как потенциальный антагонист ИЛ-5-опосредованных эффектов.

#### **Изучение эффектов действия рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$ на сократительную активность сегментов гладкомышечных клеток бронхов морских свинок с экспериментальной бронхиальной астмой**

В следующей серии экспериментов изучена способность рекомбинантного рецептора блокировать эффекты ИЛ-5 в отношении его способности повышать реактивность бронхов. Сегменты проинкубированы в среде с одновременным содержанием ИЛ-5 (0,1 мкг/мл) и рИЛ-5Р $\alpha$  (0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл), после чего оценена их сократительная активность на гистамин. В результате установлено, что рИЛ-5Р $\alpha$  при совместном инкубировании с ИЛ-5 значительно снижает максимальную амплитуду сокращения гладкомышечных сегментов обеих групп, по сравнению с результатами, полученными после инкубации только с ИЛ-5 (рис. 8 А,Б). В группе интактных животных максимальная амплитуда снижалась на 63,87% ( $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ) при концентрации рИЛ-5Р $\alpha$  1 мкг/мл, на 60,68% ( $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ) при концентрации рецептора 0,5 мкг/мл и на 43,87% ( $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ) в концентрации 0,1 мкг/мл (рис. 8А). В экспериментальной группе наблюдалась сходная картина. Максимальная амплитуда сокращения сегментов гладких мышц от животных с БА при добавлении к ним рекомбинантного рИЛ-5Р $\alpha$  в концентрации 1 мкг/мл снижалась на 63,6% ( $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ), при концентрации 0,5 мкг/мл – на 54,63% ( $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ), при концентрации 0,1 мкг/мл – на 43,32% ( $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ) (рис. 8Б).

Так как установлено наличие рецепторного комплекса ИЛ-5Р $\alpha$  на гладкомышечных клетках бронхов, то можно предположить, что рекомбинантный рИЛ-5Р $\alpha$ , действуя на гладкие мышцы, также как и на эозинофилы, конкурирует с нативным рецептором за связывание ИЛ-5. В результате ослабляется действие ИЛ-5 в отношении его способности повышать реактивность бронхов дыхательных путей на гистамин.

Инкубация сегментов, полученных от интактных животных только с рекомбинантным ИЛ-5Р $\alpha$  в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл, как и предполагалось, не давала каких-либо изменений со стороны сократительных реакций на гистаминергические воздействия. В то время как инкубация препаратов гладких мышц, изолированных от экспериментальных животных с рекомбинантным рИЛ-5Р $\alpha$  в концентрации 1 мкг/мл, приводила к достоверному снижению сократительных реакций на гистамин.

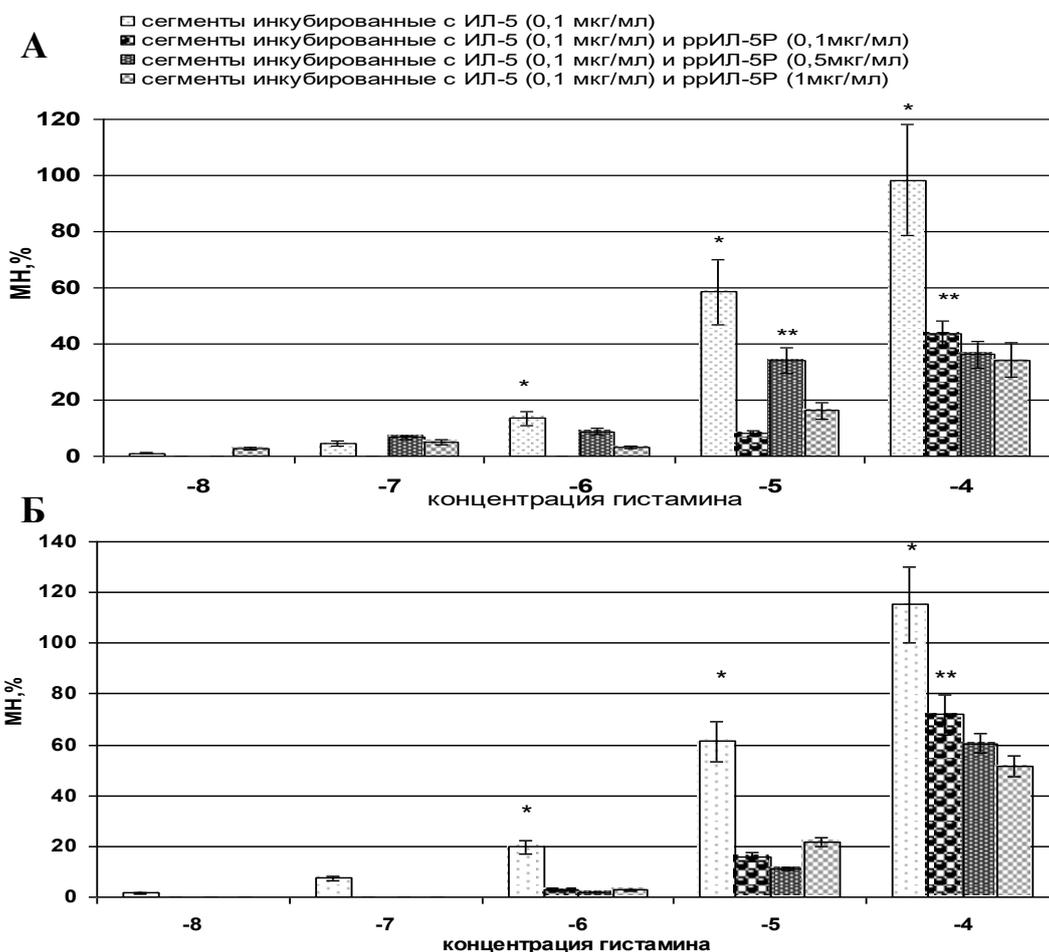


Рис. 8. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок после инкубации с ИЛ-5 и рекомбинантным рИЛ-5Р $\alpha$  (рИЛ-5Р $\alpha$ ) от lg концентрации гистамина. **А.** интактная группа. **Б.** группа с моделью бронхиальной астмы; \*-  $p < 0,05$  по сравнению с сократимостью сегментов, инкубированных с ИЛ-5 и рИЛ-5Р $\alpha$ ; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с сократимостью сегментов, инкубированных с ИЛ-5 и рИЛ-5Р $\alpha$  (1 мкг/мл).

Объяснением такому результату может быть либо присутствие у рИЛ-5Р $\alpha$  собственной релаксирующей активности по отношению к гладким мышцам дыхательных путей, либо, что более вероятно, блокирование активности эндогенного ИЛ-5. Образование эндогенного ИЛ-5 эпителиальными клетками бронхов подтверждается повышенным уровнем

мРНК ИЛ-5 в эпителизированных сегментах бронхов сенсibilизированных животных. Экзогенный рИЛ-5Р $\alpha$  блокировал патофизиологическое действие эндогенного ИЛ-5, что выражалось в снижении сократительных реакций сегментов, полученных от животных с экспериментальной БА.

Таким образом, полученные результаты подтверждают роль ИЛ-5 в воспалительном процессе, развивающимся при экспериментальной БА по эозинофил-зависимому и эозинофил-независимому пути. Предложенная технология получения рекомбинантного растворимого рецептора ИЛ-5 может послужить основой для разработки фармакологического препарата нового поколения для целенаправленной, патогенетически обоснованной терапии бронхиальной астмы.

### **Выводы**

1. Моделирование бронхоспазма у морских свинок с использованием овальбумина приводит к формированию морфологической картины легких, характерной для бронхиальной астмы у человека, развитию гиперреактивности бронхов, проявляющейся увеличением амплитуды сократительных реакций на гистамин.
2. Развитие экспериментальной бронхиальной астмы у морских свинок приводит к снижению апоптоза эозинофилов, повышению экспрессии ИЛ-5, мембраносвязанной и растворимой изоформ рецептора ИЛ-5. Сократимость гладких мышц на фоне экспериментальной бронхиальной астмы повышается, эпителизированные фрагменты гладких мышц демонстрируют повышение экспрессии мРНК ИЛ-5 и мембраносвязанной изоформы рецептора, тогда как деэпителизированные фрагменты – только мембраносвязанной формы рецептора.
3. Экспрессирующая система в *E.coli*, содержащая гибридную плазмиду рЕТ15b+ с фрагментом кДНК растворимой изоформы рецептора ИЛ-5 человека, включенным по сайтам рестрикции FauNDI и Sfr2741 позволяет получать рекомбинантный белок, демонстрирующий биологические свойства, характерные для нативного растворимого рецептора.
4. Использование рекомбинантного растворимого рецептора ИЛ-5 ингибирует эффекты как экзогенного, так и эндогенного ИЛ-5 в отношении апоптоза эозинофилов периферической крови и сократимости гладких мышц бронхов.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Экспрессия мембраносвязанной и растворимой формы рецептора интерлейкина-5 в зависимости от уровня интерлейкина-5 при бронхиальной астме // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. - Томск: СибГМУ. - 2003. - С.158-160 (соавт. А.П. Копьева, А.Э. Сазонов).
2. Влияние интерлейкина-5 на сократительную активность гладкомышечных препаратов бронхов морских свинок // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В.

- Капилевича. - Томск: СГМУ. - 2003. - С.161-162 (соавт. А.Э. Сазонов, Е.Ю. Дьякова, А.П. Копьева).
3. Роль интерлейкина-5 в механизмах апоптотической гибели эозинофилов больных бронхиальной астмой // Бюллетень Сибирской медицины. - 2003. - №2. - С.38-41 (соавт. И.И. Иванчук, А.Э. Сазонов, Ф.И. Петровский, А.П. Копьева, И.В.Петрова).
4. Induced sputum free interleukin-5 level and its mRNA expression in atopic asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. - Vienna. - 2003. - P.548 (соавт. А.Е. Sazonov, I.I. Ivanchuk, O.S. Kobyakova, N.V. Ivanova, A.P. Korieva, L.M. Ogorodova).
5. Клиническое значение исследования экспрессии гена ИЛ-5 при бронхиальной астме // Пульмонология. - 2004. - №4. - С.54-59 (соавт. А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова, О.С. Кобякова, И.И. Иванчук, Ф.И. Петровский).
6. Влияние рекомбинантного интерлейкина - 5 на апоптотическую гибель эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. - 2004. - №1-2. - С.117-120 (соавт. И.И. Иванчук, Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов, А.П. Копьева, И.В. Петрова, И.Ю. Малышев).
7. Антагонистические эффекты изоформ рецептора интерлейкина 5 при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. - 2004. - №1-2. - С.121-126 (соавт. А.Э. Сазонов, И.И. Иванчук, Л.М. Огородова, А.П. Копьева, И.В. Петрова, И.Ю. Малышев).
8. Экспрессия мРНК интерлейкина-5, мембраносвязанной и растворимой формы  $\alpha$ -субъединицы рецептора интерлейкина-5 в мокроте больных бронхиальной астмой // Физиология и патология иммунной системы. - 2004. - Т.8. - №6. - С.29-31. (соавт. А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова, О.С. Кобякова, А.П. Копьева, И.И. Иванчук)
9. Изменение экспрессии апоптотических факторов в эозинофилах при бронхиальной астме // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. - Томск: СибГМУ. - 2004. - С.200-201 (соавт. Е.С. Агеевой, И.В. Петрова, А.Э. Сазонов, И.И. Иванчук).
10. Эффекты рецептора интерлейкина 5 при бронхиальной астме // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ. - 2004. - С.213-214. (соавт. А.П. Копьева, А.Э.Сазонов, И.И. Иванчук).
11. Ассоциация полиморфных вариантов генов NO-синтаз с бронхиальной астмой // «Науки о человеке» – Сборник статей молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. - Томск: СибГМУ. - 2004. - С.212-213. (соавт. И.В. Петрова, Е.С. Агеева, Ф.И. Петровский, И.И. Иванчук).
12. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме: роль интерлейкина-5 в формировании гиперреактивности бронхов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова - 2004. - Т.90. - №10. - С.1262-1269. (соавт. Л.В.

Капилевич, Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов, Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев, Т.Н. Зайцева).

13. Peripheral blood eosinophils interleukin-5 receptor mRNA expression in atopic asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. - Copenhagen. - 2005. - P.341. (соавт. А.Е. Sazonov, I.I. Ivanchuk, L.M. Ogorodova).

14. Динамика экспрессии мРНК рецептора интерлейкина-5 в эозинофилах пациентов с atopической астмой // Всероссийская конференция «Фундаментальные науки - медицине». - Новосибирск. - 2005. - С.106. (соавт. А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова, И.И. Иванчук, И.А. Деев, О.С. Кобякова).

15. Экспрессия мРНК мембраносвязанной и растворимой изоформ субъединицы рецептора интерлейкина-5 в индуцированной мокроте и периферической крови больных бронхиальной астмой // Бюллетень сибирской медицины. - 2005. - Т.4. - №.1. - С.40-45. (соавт. А.Э. Сазонов, И.И. Иванчук, И.А. Деев, Е.В. Орлова, Е.С. Агеева, А.Г. Першина, Е.Ю. Хитринская).

### Список сокращений

БА – бронхиальная астма

ГАФДГ – глицеральдегидфосфат дегидрогеназа

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ-5 – интерлейкин-5

ИЛ-5Р – рецептор интерлейкина-5

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мИЛ-5Р $\alpha$  – мембраносвязанная изоформа рецептора к интерлейкину-5

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рИЛ-5Р $\alpha$  – растворимая изоформа рецептора к интерлейкину-5

Ni-NTA – нитрило-три-ацетат

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предварительной реакцией обратной транскрипции

Th2 – Т-хелпер II типа