

УДК: 616.248-085:616.155.32

ОСОБЛИВОСТІ ІНДУКОВАНОГО ДЕКСАМЕТАЗОНОМ АПОПТОЗУ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ З РІЗНОЮ ЇЇ КОНТРОЛЬОВАНІСТЮ

І. Ф. Ільїнська, Ю. І. Фещенко, Л. М. Курик, Ю. О. Матвієнко, Л. В. Ареф'єва

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ, Україна

Резюме. Метою даного дослідження було вивчення особливостей індукованого дексаметазоном апоптозу лімфоцитів (Лф) периферичної крові у хворих на бронхіальну астму (БА) з її контрольованим та неконтрольованим перебігом. *Матеріали та методи досліджень.* Було обстежено 54 пацієнта, у т.ч. 22 особи з контрольованою БА та 32 хворих з неконтрольованою БА. Контрольовану групу було сформовано з 11 волонтерів – осіб без клінічних ознак інфекційної та соматичної патології (умовно здорових). Визначення апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном, проводили шляхом 48 годинної інкубації гепаринізованої крові у поживному середовищі RPMI з L-глутаміном, NEPES (GIBCO) і гентаміцином у присутності 0,4 мкг/мл і 4,0 мкг/мл дексаметазону та T-клітинного мітогену – фітогемаглютиніну, яким здійснювали активацію Лф. Детекцію апоптичних Лф проводили їх фарбуванням алексином-5, кон'югованим із флюоресцеїн ізотіоціанатом, та 7-аміно-актіноміцином-D з подальшою цитометрією проб. Визначали відсоток Лф з ранніми, з ранніми й пізніми та з пізніми ознаками апоптозу, сумарні показники раннього та пізнього апоптозу, й інтегральний показник апоптозу Лф. Також розраховували частоту та виразність змін цих показників (підвищення/зниження). Для вивчення залежності апоптозу Лф від дози дексаметазону, оцінювали співвідношення показників апоптозу Лф при його індукції 4,0 мкг/мл та 0,4 мкг/мл дексаметазону, і при співвідношенні > 1,0 визначали посилення індукції апоптозу Лф, а при співвідношенні ≤ 1,0 визначали відсутність/ послаблення індукції апоптозу Лф при збільшенні терапевтичної дози дексаметазону. *Результати.* Було виявлено підвищення у 2,8 рази середнього значення інтегрального показника індукованого дексаметазоном апоптозу Лф у групі хворих на контрольовану БА переважно за рахунок його ранніх етапів та відсутність цих змін у групі хворих з неконтрольованим перебігом хвороби. Продемонстровано, що адаптаційне посилення апоптозу Лф, індукованого терапевтичною дозою дексаметазону (0,4 мкг/мл), відбувалося у 54,5 % хворих з контрольованою БА в середньому на 151,9 %, тоді як при неконтрольованій БА воно мало місце тільки у 31,3 % хворих, а його виразність була у 2,6 рази меншою (58,8 %). Установлено, що відсутність посилення апоптозу Лф, індукованого даною дозою дексаметазону, було виявлено у 45,5 % хворих на контрольовану БА та у 69,7 % хворих з її неконтрольованим перебігом, що може свідчити про наявність у них стероїдорезистентності. З'ясовано, що 10-разове збільшенні терапевтичної дози дексаметазону у 72,7 % хворих на контрольовану БА не супроводжується посиленням апоптозу Лф, що може говорити про те, що вони отримують максимально ефективні дози ГКС, і тому їх подальше збільшення не є доцільним. У той же час майже 2/3 хворих з неконтрольованою БА демонструють підвищення апоптозу Лф при збільшенні дози ГКС для його індукції, що є характерним для стероїдочутливих та стероїдозалежних пацієнтів. *Висновки.* У кожного третього хворого з неконтрольованою БА збільшення дози ГКС не призводить до посилення апоптозу Лф, що може свідчити про стероїдорезистентність і вважатися показанням до призначення таргетних препаратів.

Ключові слова: бронхіальна астма, контрольованість, індукований дексаметазоном апоптоз лімфоцитів.

І. Ф. Ільїнська

Старший науковий співробітник, доктор медичних наук,

старший науковий співробітник лабораторії клінічної імунології

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України,

вул. М. Амосова, 10, м. Київ, Україна, 03038,

e-mail: ilyinskaya@ukr.net

Астма та Алергія, 2020, № 3, С. 55–64.

В світі нараховується близько 300 млн. хворих на бронхіальну астму (БА), і за прогнозами до 2025 р. їх кількість становитиме 400 млн. [1]. В Україні поширеність БА складає $\geq 10,1\%$, а рівень захворюваності становить 10 514 на кожні 100 тис дорослого населення [2]. Вартість їхнього лікування сягає 60,0 % від усіх витрат, пов'язаних з астмою, а за показниками економічних збитків наближається або перевищує рівень витрат на пацієнтів з цукровим діабетом, цирозом печінки, шизофренією та хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) [1, 3]. Бронхіальна астма — хронічне генетично детерміноване захворювання, гетерогенне за своєю природою і варіабельне за перебігом, метою лікування якого виступає досягнення стійкого контролю над хворобою. В останнє десятиріччя відбулися революційні зміни у фармакотерапії БА, були проведені масштабні молекулярно-генетичні та фармако-генетичні дослідження, створені таргетні препарати, але попри це рівень адекватного контролю над цим захворюванням залишився невисоким. У (10,0–25,0) % хворих діагностується важкий перебіг захворювання з ознаками терапевтичної резистентності, з них у 20,0 % — до глюкокортикостероїдів (ГКС) [4]. У разі БА, стійкої до ГКС, їх клінічне застосування малоефективне. Тому виявлення стероїдорезистентності при БА є вкрай важливим для прогнозування її неконтрольованого перебігу: це дозволяє своєчасно провести корекцію терапії й сприяє підвищенню ефективності лікування хворих на цю недугу.

Відомо, що протизапальна дія ГКС реалізується багатьма механізмами, серед яких головними виступають: інгібіція проліферативної відповіді лімфоцитів (Лф) на мітогени, що призводить до пригнічення продукції антиген (алерген)-реактивних клітин, а також індукція їх апоптозу, що призводить до елімінації ефektorів запального процесу [5]. Порушення їх елімінації внаслідок пригнічення апоптозу призводить до тривалої персистенції та скупчення цих клітин, виступає одним з важливих механізмів підтримки запалення при БА та важливим фактором, що викликає гіперреактивність дихальних шляхів [6].

Апоптоз, як правило, визначається як генетична програма, яка спрямована на елімінацію старих або пошкоджених клітин. Апоптоз — одна з форм програмованої (генетично детермінованої) клітинної смерті з характерними морфологічними та біохімічними ознаками, серед яких накопичення фосфатидилсерину в зовнішньому моношарі цитоплазматичної мембрани, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, розпад клітин на апоптозні тільця є найбільш значущими [7]. Хоча терміни «апоптоз» та «програмована клітинна смерть» зазвичай використовуються як синоніми, насправді «програмована клітинна смерть» — це сукупність послідовних та складних біохімічних процесів, які відбуваються в клітині, а «апоптоз» — їх морфологічне втілення [8]. Результати досліджень з вивчення апоптозу Лф, проведені у минулі роки у хворих з різним перебігом

БА, досить суперечливі [9–13], тому **метою даної роботи** було вивчення особливостей індукованого ГКС апоптозу Лф периферичної крові у хворих на бронхіальну астму з її контрольованим та неконтрольованим перебігом

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводилися за кошти державного бюджету України в ДУ «Національний інститут фізіології та пульмонології ім. Ф. Г. Яновського Національної академії медичних наук України» на базі відділення пульмонології та лабораторії клінічної імунології.

Об'єктом дослідження були хворі на БА з різною її контрольованістю. В дослідження включали пацієнтів лише за умови їх добровільної згоди з метою та об'ємом запланованих обстежень. Критеріями їх включення у дослідження були: чоловіки та жінки у віці від 18 до 75 років, наявність БА (з контрольованим та неконтрольованим її перебігом), можливість та бажання брати участь у дослідженнях з наявністю письмової інформованої згоди. Критерії виключення об'єктів з дослідження: наявність у хворого таких тяжких захворювань та станів як туберкульоз, ВІЛ/СНІД, декомпенсована печінкова або ниркова недостатності та інші, які суттєво впливають на його стан, клінічні та імунологічні показники і вимагають додаткового лікування, а також вагітність та відсутність інформованої згоди на участь у дослідженні.

Було обстежено 54 пацієнта, середній вік пацієнтів складав $(50,7 \pm 3,6)$ років. У групу хворих на контрольовану БА було включено 22 особи, у тому числі 2 (9,1 %) чоловіків та 20 жінок (90,9 %). Більшість хворих на контрольовану БА були працездатного віку: шестеро (36,3 %) — у віці 30–50 років і 14 (63,6 %) — 51–70 років. У цій групі тяжку БА було визначено у 14 (63,6 %) пацієнтів, а у 8 хворих (36,4 %) була встановлена середня тяжкість хвороби. У групу хворих на неконтрольовану БА було включено 32 пацієнти, у т.ч. 4 чоловіків (12,5 %) та 28 жінок (87,5 %). Більшість з них (22 особи — 68,8 %) належали до вікової групи 51–70 років. Середній вік пацієнтів складав $(55,6 \pm 2,6)$ років ($p > 0,05$). У цій групі БА середньої тяжкості була діагностована у 4-х пацієнтів (12,5 %), а решта — 28 (87,5 %) хворих мали тяжку БА. Контрольну групу було сформовано з 11 волонтерів — осіб без клінічних ознак інфекційної та соматичної патології (умовно здорових). Більшість з них (8 осіб — 72,7 %) належали до вікової групи 31–50 років, їх середній вік складав $(45,7 \pm 2,5)$ %.

Для оцінки контрольованості БА користувалися критеріями, які засновані на міжнародних рекомендаціях [1, 14] та наведені в уніфікованому клінічному протоколі первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Бронхіальна астма» [15].

Визначення апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном, проводили шляхом інкубації гепаринізованої крові у поживному середовищі RPMI з L-глютаміном, HEPES (GIBCO) і гентаміцином у

присутності двох доз дексаметазону та Т-клітинного мітогену — фітогемаглютиніну (ФГА), яким здійснювали активацію Лф (з огляду на те, що неактивні Лф стійки до апоптозу). Для цього по 500 мкл гепаринізованої крові вміщували у 2 пластикові пробірки ємністю 1,0–1,5 мл. У кожену пробірку, вносили по 500 мкл гепаринізованої крові, додавали по 300 мкл повного поживного середовища RPMI (з L-глутаміном, NEPEP і 1,0 % гентаміцину) та 100 мкл ФГА, розведеного до кінцевої концентрації 12,5 мкг/мл (для приготування робочого розчину до 0,25 мл рідкого ФГА додавали 1,25 мл повного поживного середовища). У першу пробірку додавали розчин дексаметазону в терапевтичному дозуванні (робочому розведенні 0,4 мкг/мл, для чого дексаметазон розводили повним поживним середовищем у 100 разів), у другу пробірку додавали дексаметазон у робочому розведенні 4,0 мкг/мл (для чого дексаметазон розводили повним поживним середовищем у 10 разів). Пробірки щільно закривали та проводили їх інкубацію 48 годин при температурі 38 °С. По завершенні інкубації проби центрифугували 10 хвилин при 100 g і температурі 4 °С, відмивали льодяним поживним середовищем та тримали пробірки в ємності з льодом. Після цього для виявлення відсотку апоптичних Лф проводили їх фарбування люмінесцентними фарбниками [16, 17]: анексином 5 (An-5), коньюгованим із флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC), для визначення відносного вмісту лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу та 7-аміно-актіноміцином-D (7-Amino Actinomycin D — 7AAD) для визначення відносного вмісту Лф з пізніми ознаками апоптозу. Для цього супернатант видаляли, з верхнього шару осаду відбирали 100 мкл та ресуспендували його в 200 мкл зв'язуючого буфера, розведеного у 10 разів. Після цього 50 мкл розведеної буфером крові переносили у пробірки для проточного цитофлуориметра, додавали по 5 мкл An-5- FITC та по 10 мкл 7AAD, проводили їх інкубацію 15 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, після чого додавали по 200 мкл зв'язуючого буфера, витримували 10 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, лізували 2 мл стандартного лізуючого розчину 15 хвилин в темряві та проводили проточну цитометрію проб. У кожній пробі визначали відсоток Лф з ранніми ознаками апоптозу (A+/7AAD–Лф), з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (A5+/7AAD+Лф) і пізніми ознаками апоптозу (A5–/7AAD+). Визначали сумарні показники раннього та пізнього апоптозу (A5+Лф усі та 7AAD+Лф усі), їх суму — інтегральний показник апоптозу Лф (A5+Лф усі)+ (7AAD+Лф усі), а також розраховували частоту та виразність змін цих показників (підвищення/зниження).

Для вивчення залежності апоптозу Лф від дози дексаметазону, яким він індукувався, визначали співвідношення показників раннього, пізнього та інтегрального показників апоптозу Лф у присутності дексаметазону у дозі 4,0 мкг/мл та 0,4 мкг/мл: відповідно, ДМ1/ДМ2, і при отриманні співвідношення > 1,0 визначали посилення індукції апоптозу

Лф при збільшенні дози дексаметазону, а при отриманні співвідношення $\leq 1,0$ визначали відсутність/послаблення індукції апоптозу Лф при збільшенні дози дексаметазону.

Отриманий у ході дослідження цифровий матеріал у кожній окремій вибірці був перевірений на нормальне розподілення величин. Для перевірки нормальності розподілу даних використовували методику Лапач С. Н. та ін. (2001) (функцію NORMSAMP-1, яка вбудовується в середовище Excel) [18]. За отриманими результатами визначали вибір методу подальшої статистичної обробки даних для підтвердження вірогідності результатів. Для оцінки достовірності відмінностей середніх значень показників у вибірках із нормальним розподілом використовували двосторонній *t*-критерій Ст'юдента (для залежних та незалежних вибірок). За рівень вірогідності приймалося значення показника вірогідності (*p*) між групами, яке дорівнювало, або було меншим за 0,05. При відсутності нормальності розподілу для обчислювання вірогідності різниці середніх показників застосовувався двовибірковий критерій Уїлкоксона, оцінка якого проводилась шляхом їх порівняння з максимальним та мінімальним критеріальними значеннями. При аналізі індивідуальних змін досліджуваних показників було застосовано метод альтернативного варіювання [18].

Результати досліджень зберігалися на паперовому та електронному носіях. Математична обробка отриманих даних проводилася за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входили до пакету Microsoft Office Professional 2007, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 43437596. Робота виконана державним коштом.

Результати та їх обговорення

Результати вивчення індукованого дексаметазоном апоптозу Лф представлені у табл. 1. Як свідчать представлені дані, у групі хворих на контрольовану БА відбувалося посилення майже в'ятеро середніх показників раннього апоптозу Лф при його індукції дексаметазоном у дозі 0,4 мкг/мл — до $(30,3 \pm 6,8) \%$ у порівнянні з референтним значенням $(6,2 \pm 2,2) \%$; $p < 0,05$. Це обумовило збільшення у 4 рази сумарного показника раннього апоптозу — до $(46,8 \pm 9,0) \%$ при референтних значеннях $(11,9 \pm 4,7) \%$; $p < 0,05$ та збільшення у 2,8 рази середнього значення інтегрального показника індукованого дексаметазоном апоптозу Лф — до $(55,2 \pm 8,3) \%$, при референтних значеннях $(20,8 \pm 5,3) \%$; $p < 0,05$. У групі пацієнтів з неконтрольованою БА середній показник вмісту Лф з ранніми ознаками апоптозу та сумарний показник раннього апоптозу Лф при їх індукції 0,4 мкг/мл дексаметазону майже вдвічі перевищували референтні значення і склали відповідно $(12,6 \pm 2,3) \%$ та $(21,2 \pm 3,1) \%$; $p < 0,05$, проте вони виявилися майже вдвічі меншими у порівнянні з аналогічними показниками групи хворих на контрольовану БА. В обох групах пацієнтів істотних відмінностей від референтних середніх значень показників пізнього

Таблиця 1. Показники індукованого дексаметазоном апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю

Показники апоптозу лімфоцитів, індукованого дексаметазоном (%)	Групи обстежених		
	Здорові особи (n = 11)	Хворі на бронхіальну астму	
		контрольовану (n = 22)	неконтрольовану (n = 32)
	M ± m (%)	M ± m (%)	M ± m (%)
Апоптоз лімфоцитів, індукований дексаметазоном у дозі 0,4 мкг/мл			
Анексин 5+/7AAD– Лф	6,2 ± 2,2	30,3 ± 6,8*	12,6 ± 2,3 [#]
Анексин 5+/7AAD+ Лф	5,7 ± 2,6	16,5 ± 5,3*	8,5 ± 1,4
Анексин 5–/7AAD+ Лф	8,9 ± 2,5	8,3 ± 4,6	6,0 ± 0,9
Анексин 5+ALL Лф	11,9 ± 4,7	46,8 ± 9,0*	21,2 ± 3,1 [#]
7AAD+ALL Лф	14,5 ± 3,7	24,9 ± 6,1	14,5 ± 1,7
(Анексин 5+ALL) + (7AAD+ ALL) Лф	20,8 ± 5,3	55,2 ± 8,3*	27,1 ± 3,4 [#]
Апоптоз лімфоцитів, індукований дексаметазоном у дозі 4,0 мкг/мл			
Анексин 5+/7AAD– Лф	6,5 ± 2,6	32,2 ± 7,8*	11,9 ± 2,7 [#]
Анексин 5+/7AAD+ Лф	4,8 ± 1,7	13,6 ± 3,9*	7,0 ± 2,0
Анексин 5–/7AAD+ Лф	11,4 ± 2,9	5,4 ± 1,7*	5,2 ± 1,6*
Анексин 5+ALL Лф	11,2 ± 4,2	45,7 ± 8,7*	18,8 ± 4,3 [#]
7AAD+ ALL Лф	16,2 ± 3,5	19,0 ± 5,0	12,2 ± 2,5
(Анексин 5+ALL) + (7AAD+ ALL) Лф	22,6 ± 4,9	51,2 ± 8,6*	24,0 ± 5,0 [#]

Примітки: Анексин 5+/7AAD– Лф – лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; Анексин 5–/7AAD+ Лф – лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; Анексин 5+/7AAD+ Лф – лімфоцити з ранніми та пізніми ознаками апоптозу; Анексин 5+ALL – усі лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+ALL Лф – усі лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; (Анексин 5+ALL) + (7AAD+ ALL) сумарний показник апоптозу Лф; * – різницю показника у порівнянні з референтними статистично підтверджено (p < 0,05); [#] – різницю показника у порівнянні з показником групи з контрольованою БА статистично підтверджено (p < 0,05).

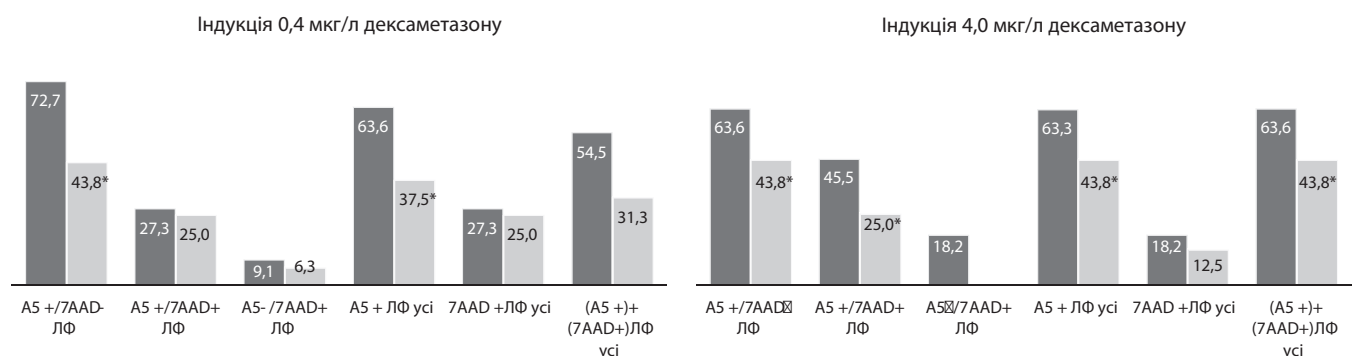
апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном у дозі 0,4 мкг/мл, знайдено не було.

Майже такі самі результати були отримані при вивченні показників апоптозу Лф, індукованого 4,0 мкг/мл дексаметазону: збільшення середнього показника раннього апоптозу Лф та середнього показника інтегрального апоптозу Лф у групі хворих з контрольованою БА та відсутність таких змін у групі пацієнтів з неконтрольованим перебігом хвороби. Дозозалежного ефекту при порівнянні середніх значень досліджених показників у відповідних групах визначено не було.

Зростання показників раннього апоптозу Лф при його індукції 0,4 мкг/мл дексаметазону, при контрольованій БА було виявлено у 14 (63,6 %) пацієнтів з

контрольованою БА (рис. 1) й у 12 (37,5 %) хворих з неконтрольованим перебігом хвороби p < 0,05). Підвищення сумарного показника пізнього апоптозу Лф при його індукції даною дозою дексаметазону було зафіксоване однаково часто в обох групах: у 6 (27,3 %) хворих на контрольовану БА й у 8 (25,0 %) пацієнтів з неконтрольованим її перебігом. Понад половини хворих з контрольованим перебігом БА (12 осіб – 54,5 %) мали підвищення інтегрального показника апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном у дозуванні 0,4 мкг/мл, а серед пацієнтів з неконтрольованою БА – лише кожен третій – 10 хворих з 32 (31,3 %; p < 0,05).

При використанні 4,0 мкг/мл дексаметазону зростання сумарного показника раннього апоптозу



Примітки тут і на рис. 2–5: ■ – контрольована БА; □ – неконтрольована БА; A5+/7AAD–Лф – лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; A5+/7AAD+Лф – лімфоцити з ранніми та пізніми ознаками апоптозу; A5–/7AAD+ Лф – лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; A5+ Лф усі – усі лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+ Лф усі – усі лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; (A5+) + (7AAD+) Лф усі – лімфоцити з ознаками апоптозу; * – різницю показника у порівнянні з показником групи хворих з неконтрольованою БА статистично підтверджено (p < 0,05).

Рисунок 1. Частота підвищення апоптозу лімфоцитів, індукованого дексаметазоном, у %.

Лф було зафіксовано також у 14 (63,6 %) пацієнтів при контрольованій БА та у 14 (43,8 %) випадків неконтрольованого перебігу хвороби ($p < 0,05$). Збільшення сумарного показника пізнього апоптозу Лф, індукованого 4,0 мкг/мл дексаметазону, відбувалося у незначній й однакової кількості пацієнтів обох груп: відповідно у 4 (18,2 %) випадків при контрольованій БА й у 4 (12,5 %) випадках при неконтрольованій. Підвищення інтегральних показників апоптозу Лф, індукованого 4,0 мкг/мл дексаметазону, мало місце у 14 (63,6 %) хворих на контрольовану БА та у 14 (43,8 %) пацієнтів з неконтрольованою БА.

Звертає на себе увагу те, що збільшення інтегральних показників апоптозу Лф, індукованого як 0,4 мкг/мл, так і 4,0 мкг/мл дексаметазону відбувалося, в основному, за рахунок посилення його ранніх етапів.

Це знайшло своє підтвердження й при визначенні виразності змін показників індукованого дексаметазоном апоптозу Лф. Так, зростання частоти зростання практично усіх показників апоптозу Лф, індукованого 0,4 мкг/мл дексаметазону, при контрольованій БА було суттєво більшим, ніж у хворих з неконтрольованим перебігом хвороби (рис. 2): частота підвищення показників апоптозу Лф з ранніми ознаками апоптозу у групі хворих на контрольовану БА зростала більше ніж у 2,5 разів (відповідно на 289,6 % та 115,7 %; $p < 0,05$), з ранніми та пізніми ознаками апоптозу — у 3,2 рази (відповідно на 262,4 % та на 80,8 %; $p < 0,05$), з пізніми ознаками апоптозу — у 30,4 рази (на 423,0 % та 13,9 %, відповід-

но; $p < 0,05$). Частота зростання сумарного показника раннього апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном, у цій групі хворих збільшувався на 204,8 %, у групі пацієнтів з неконтрольованою БА у 2,3 менше — всього на 88,6 %. Сумарний показник пізнього апоптозу зростав у 8,0 разів більше у пацієнтів з контрольованим перебігом хвороби, ніж у пацієнтів з неконтрольованою БА — відповідно на 213,9 % і на 26,3 % ($p < 0,05$). Частота збільшення інтегральних показників апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном у дозуванні 0,4 мкг/мл, складала відповідно 151,9 % при контрольованій БА і майже втричі менше при неконтрольованій (58,8 %; $p < 0,05$).

Виразність підвищення усіх показників апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном у дозі 4,0 мкг/мл, при контрольованій БА теж виявилася суттєво більшою, ніж при неконтрольованій (рис. 2). Так, ранній апоптоз Лф у групі хворих на контрольовану БА збільшувалася в середньому на 247,9 %, а в групі пацієнтів з неконтрольованою БА — тільки на 82,0 % ($p < 0,05$), що було майже у 3,0 рази меншим. Виразність збільшення сумарного показника пізнього апоптозу Лф, індукованого цією дозою дексаметазону, при контрольованій БА сягала 145,0 %, а у пацієнтів з неконтрольованою БА всього 8,0 %. Виразність підвищення інтегральної кількості апоптичних Лф під впливом 4,0 мкг/мл дексаметазону при контрольованій БА дорівнювала 133,6 % і всього 37,1 % при неконтрольованому її перебігу ($p < 0,05$).

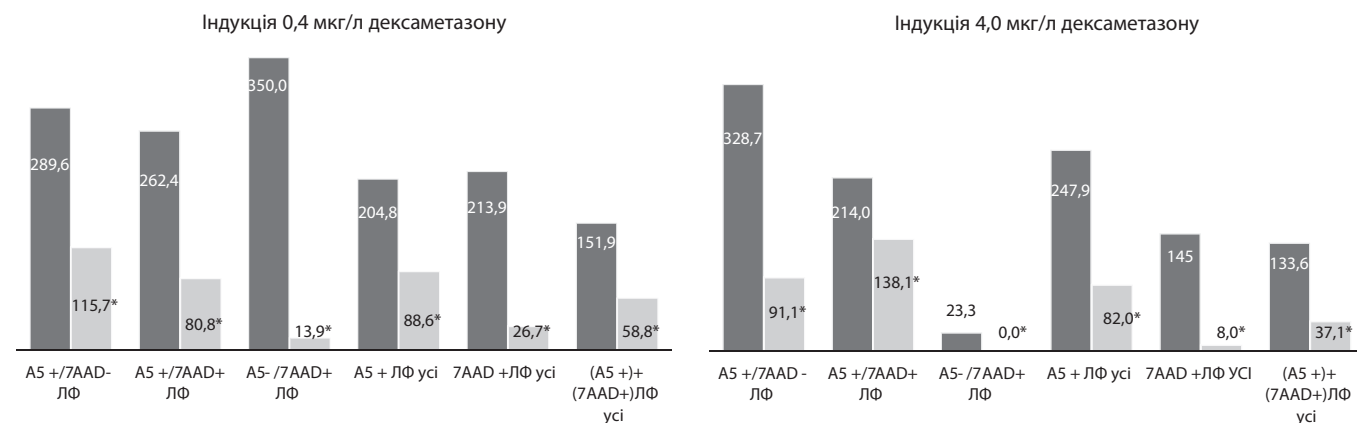


Рисунок 2. Виразність підвищення індукованого дексаметазоном апоптозу лімфоцитів у хворих з різною контрольованістю бронхіальної астми, у %.

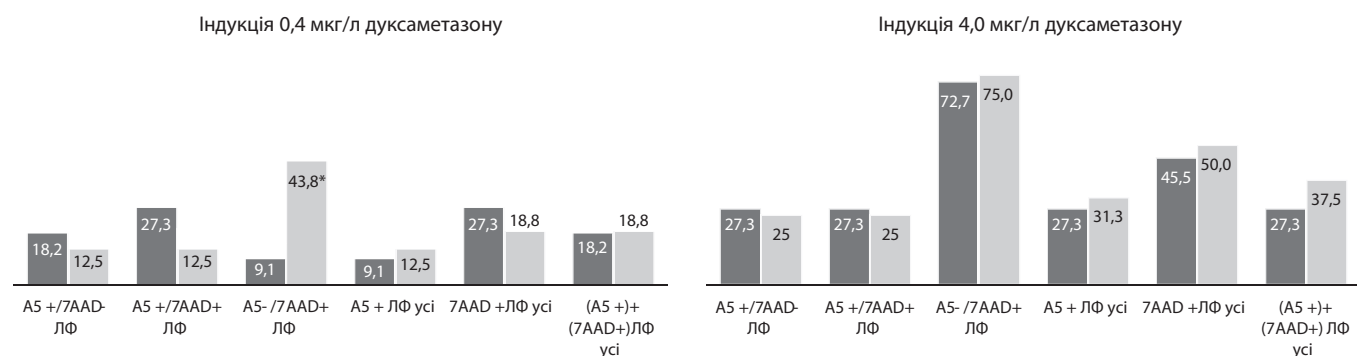


Рисунок 3. Частота зменшення показників апоптозу лімфоцитів при застосуванні дексаметазону у хворих з різною контрольованістю бронхіальної астми, у %.

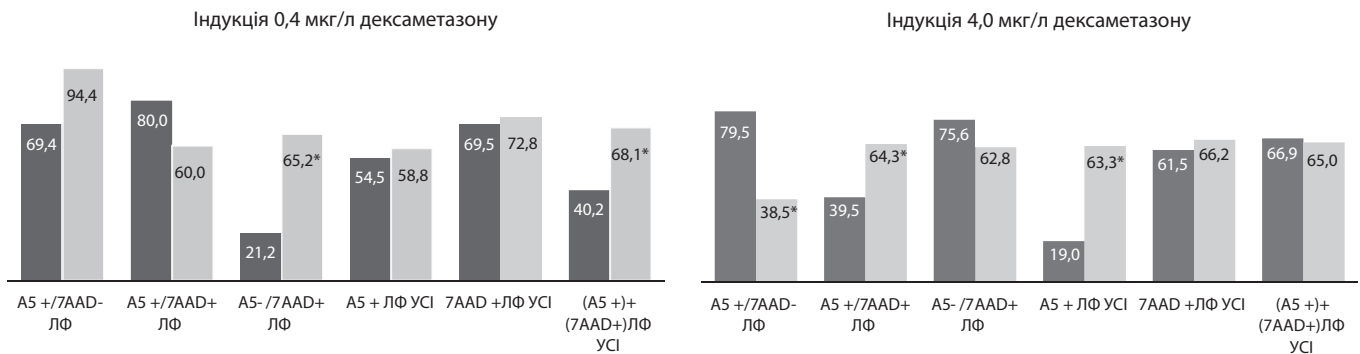


Рисунок 4. Виразність зниження індукованого дексаметазоном апоптозу лімфоцитів у хворих з різною контрольованістю бронхіальної астми, у %.

При визначенні частоти падіння значення у показниках апоптозу Лф при застосуванні 0,4 мкг/мл дексаметазону, було з'ясовано, що воно мало місце у незначній кількості обстежених хворих на БА обох груп (рис. 3), а висока частота зменшення кількості Лф з пізніми ознаками апоптозу у пацієнтів з неконтрольованою БА (43,8 %) нівелювалася зменшенням вмісту Лф з ранніми та пізніми його ознаками у цій групі. Звертає на себе увагу те, що зниження апоптозу Лф при застосуванні для його індукції 0,4 мкг/мл дексаметазону при неконтрольованій БА було у 1,7 разів більш виразним, ніж при контрольованій (рис. 4), і складало 68,1 % (у порівнянні з 40,2 %; $p < 0,05$). Знижені показники раннього апоптозу Лф при застосуванні 4,0 мкг/мл дексаметазону для його індукції були виявлені у третини пацієнтів з БА обох груп — відповідно у 6 (27,3 %) хворих на контрольовану БА та у 10 (31,3 %), з неконтрольованим її перебігом. Зменшення сумарних показників пізнього апоптозу Лф було встановлено також у однакової кількості хворих цих груп: у 10 (45,0 %) пацієнтів з контрольованою БА та кожного другого пацієнта при неконтрольованій. Зниження інтегрального показника апоптозу Лф при його індукції дексаметазоном у дозі 4,0 мкг/мл було знайдено у 6 (27,3 %) хворих на контрольовану БА та у 12 (37,5 % пацієнтів з неконтрольованим перебігом хвороби.

Вивчення виразності зменшення показників апоптозу під впливом 0,4 мкг/мл дексаметазону (рис. 4) продемонструвало достовірно більш суттєве

зниження показників раннього апоптозу Лф при неконтрольованій БА (на 94,4 % у порівнянні з 69,4 % при контрольованому перебігу хвороби; $p < 0,05$), пізнього (відповідно на 65,2 % при неконтрольованій БА у порівнянні з 21,2 % при контрольованому її перебігу) та інтегрального апоптозу Лф (на 68,1 % при неконтрольованій БА у порівнянні з 40,2 % при контрольованому перебігу хвороби; $p < 0,05$). При застосуванні 4,0 мкг/мл дексаметазону виразність зниження сумарного показника раннього апоптозу Лф при неконтрольованій БА була втричі більшою, ніж при контрольованій, тоді як міжгрупових відмінностей виразності зменшення сумарного показника пізнього апоптозу Лф та інтегрального показника апоптозу Лф виявлено не було.

Референтні рівні раннього апоптозу Лф при його індукції дексаметазоном у дозі 0,4 мкг/мл теж визначалися частіше при неконтрольованій БА, ніж при контрольованій: відповідно у 50,0 % та 9,1 % випадків ($p < 0,05$), тобто частіше у 5,5 рази (рис. 5). Референтні значення інтегрального показника апоптозу Лф, індукованого дексаметазоном у дозуванні 0,4 мкг/мл, були встановлені у 50,0 % хворих на неконтрольовану БА і тільки у 27,3 % пацієнтів з контрольованим її перебігом ($p < 0,05$). Варто зазначити, що референтні рівні сумарного показника раннього апоптозу Лф при його індукції 4,0 мкг/мл дексаметазону у групі хворих на контрольовану БА були зафіксовані у поодиноких випадках (9,1 %) і в 3,4 рази частіше (у 31,3 %) у групі пацієнтів з неконтрольованим перебігом хвороби ($p < 0,05$).

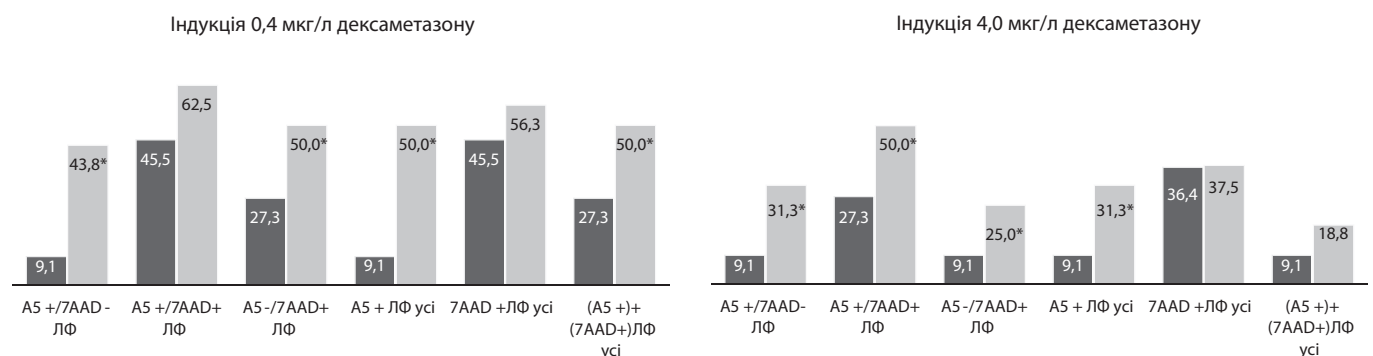


Рисунок 5. Частота референтних рівнів апоптозу лімфоцитів, індукованого дексаметазоном, у хворих з різною контрольованістю бронхіальної астми, у %.

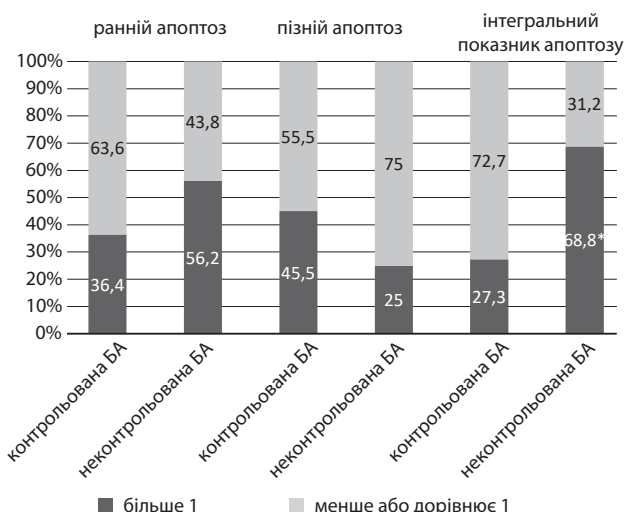


Рисунок 6. Дозозалежність індукції дексаметазоном апоптозу лімфоцитів у хворих з різною контрольованістю бронхіальної астми (при його застосуванні 4,0 мкг/мл та 0,4 мкг/мл, відповідно).

Частота референтних значень сумарного показника пізнього апоптозу відзначалася однаково часто у хворих обох груп (у 36,4 % та 37,5 %, відповідно). Референтні значення інтегрального показника апоптозу Лф при його індукції 4,0 мкг/мл дексаметазону мали місце у невеликій кількості пацієнтів обох груп (у 9,1 % та 18,8 %, відповідно).

Вивчення залежності апоптозу Лф від дози дексаметазону, яким він індукувався, показало, що при збільшенні терапевтичної дози дексаметазону у 10 разів посилення раннього апоптозу Лф відбувалося тільки у 36,4 % хворих на контрольовану БА та у 56,2 % хворих на БА з неконтрольованим її перебігом (рис. 6). У 63,6 % хворих на контрольовану БА відбувалося послаблення індукції раннього апоптозу Лф та у 43,8 % з неконтрольованим перебігом хвороби. Посилення пізнього апоптозу Лф при збільшенні дози дексаметазону з 0,4 мкг/мл до 4,0 мкг/мл мало місце у 45,5 % випадків при контрольованій БА та у 25,0 % при неконтрольованій. Збільшення інтегрального показника апоптозу Лф при 10-разовому зростанні дози дексаметазону відбувалося лише у 27,3 % пацієнтів з контрольованою БА, а у хворих на неконтрольованій її перебіг — у 68,8 % випадків ($p < 0,05$). У 72,7 % хворих на контрольовану БА зафіксовано послаблення індукції апоптозу Лф при збільшенні дози дексаметазону з 0,4 мкг/мл до 4,0 мкг/мл, що було у 2,3 рази частішим, ніж при неконтрольованій БА (відповідно у 31,3 % випадків; $p < 0,05$). Посилення апоптозу Лф при застосуванні для його індукції дексаметазону у

дозі 4,0 мкг/мл у порівнянні з 0,4 мкг/мл у групі хворих на неконтрольовану БА виявилось виразнішим у 12 разів, ніж у групі пацієнтів з контрольованим її перебігом (відповідно 451,0 % та 38,1 %; $p < 0,05$).

Отримані результати свідчать про те, що при контрольованій БА 72,7 % пацієнтів отримують максимально ефективні дози ГКС, тому їх подальше збільшення не матиме позитивного ефекту, тоді як майже 2/3 хворих з неконтрольованою БА демонструють підвищення апоптозу Лф при збільшенні дози ГКС для його індукції, що є характерним для стероїдочутливих та стероїдозалежних пацієнтів. У кожного третього хворого на неконтрольовану БА збільшення дози ГКС не призводить до посилення апоптозу Лф, що може свідчити про стероїдорезистентність і вважатися показанням до призначення таргетних препаратів.

Висновки

Продемонстровано підвищення у 2,8 рази середнього значення інтегрального показника індукованого дексаметазоном апоптозу Лф у групі хворих на контрольовану БА переважно за рахунок ранніх його етапів і відсутність цих змін у групі хворих з неконтрольованим перебігом хвороби.

Визначено, що адаптаційне посилення апоптозу Лф, індукваного терапевтичною дозою дексаметазону (0,4 мкг/мл), відбувається у 54,5 % хворих на контрольовану БА в середньому на 151,9 %, тоді як при неконтрольованій БА воно має місце тільки у 31,3 % хворих, а його виразність є у 2,6 рази меншою (58,8 %).

Відсутність посилення апоптозу Лф, індукваного даною дозою дексаметазону, виявлено у 45,5 % хворих на контрольовану БА та у 69,7 % хворих з її неконтрольованим перебігом, що може свідчити про наявність у них стероїдорезистентності.

З'ясовано, що 10-разове збільшенні терапевтичної дози дексаметазону у 72,7 % хворих на контрольовану БА не супроводжується посиленням апоптозу Лф, що може говорити про те, що вони отримують максимально ефективні дози ГКС, і тому їх подальше збільшення не є доцільним. У той же час майже 2/3 хворих на неконтрольовану БА демонструють підвищення апоптозу Лф при збільшенні дози ГКС для його індукції, що є характерним для стероїдочутливих та стероїдозалежних пацієнтів. Проте у кожного третього хворого на неконтрольовану БА збільшення дози ГКС не призводить до посилення апоптозу Лф, що може свідчити про стероїдорезистентність і вважатися показанням до призначення таргетних препаратів.

THE FEATURES OF DEXAMETHASONE-INDUCED LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN PATIENTS WITH DIFFERENT CONTROLLABILITY OF BRONCHIAL ASTHMA

I. F. Illyinska, Y. I. Feshchenko, L. M. Kuryk, Y. A. Matvienko, L. V. Arefyeva

Yanovsky National Institute Phthysiology and pulmonology NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract. The aim of this study was to investigate the characteristics of peripheral blood- lymphocyte (Lph) apoptosis induced by dexamethasone in patients with controlled and uncontrolled course of bronchial asthma (BA). *Materials and research methods.* 54 BA patients were examined, including 22 with controlled BA and 32 patients with uncontrolled BA. The control group was formed of 11 volunteers — individuals without clinical signs of infectious and somatic pathology (conditionally healthy). The determination of Lph apoptosis induced by dexamethasone was carried out by 48-hour incubation of heparinized blood in RPMI medium with L-glutamine, HEPES (GIBCO) and gentamicin in the presence of 0.4 µg / ml and 4.0 µg / ml of dexamethasone and T-cell mitogen – phytohemagglutinin, which was used to activate Lph. Apoptotic Lph were detected by their staining with Anexin-5 conjugated with fluorescein isothiocyanate and 7-amino-Actinomycin-D with sample cytometry followed. The percentage of lymphocytes with early, with early and late and late signs of apoptosis, the total indicators of early and late apoptosis, and the integral indicator of lymphocyte apoptosis were determined. Also, the frequency and severity of these indicators changes (increase / decrease) were calculated. In order to study the dependence of Lph apoptosis on the dose of dexamethasone, the ratio of Lph apoptosis induced by 4.0 µg / ml and 0.4 µg / ml of dexamethasone was evaluated, and if this ratio was > 1.0 the increase of Lph apoptosis induction by elevated dexamethasone dose was determined and if this ratio was > 1 0, the absence / attenuation of higher then therapeutic dose of dexamethasone Lph apoptosis induction was determined. *Results.* A 2.8-fold increase of the average value of the integral indicator of Lph dexamethasone-induced apoptosis in the group of patients with controlled asthma was revealed mainly due to its early stages and the absence of these changes in the group of patients with an uncontrolled course of the disease was shown. It was demonstrated that the adaptive enhancement of Lph apoptosis induced by a therapeutic dose of dexamethasone (0.4µg/ml) was occurred in 54.5 % of patients with controlled BA by an average of 151.9 %, whereas in uncontrolled BA it occurred only in 31.3 % of patients, and its severity was in 2.6 times less (58.8 %). It was established that the absence of increased Lph apoptosis induced by this dexamethasone dose was found in 45.5 % patients with controlled asthma and in 69.7 % of patients with its uncontrolled course, which may indicate that they have steroid resistance. It was detected that a 10-fold increasing of the therapeutic dexamethasone dose in 72.7 % patients with controlled asthma is not accompanied by increasing of Lph apoptosis which suggests that they receive the most effective doses of glucocorticosteroids (GCS), and therefore their further increase is not advisable. At the same time, near 2/3 of patient with uncontrolled BA demonstrate Lph apoptosis increasing with higher doses of GCS for its induction, which is typical for steroid-sensitive and steroid-dependent patients. *Conclusions.* In every third patient with an uncontrolled BA the increase of GCS dose does not lead to increasing of Lph apoptosis that can testify to steroid resistance and be considered such an indication for the targeted drugs appointment.

Key words: bronchial asthma, controllability, dexamethasone-induced lymphocyte apoptosis.

I. F. Illyinskaya,

Senior scientific worker, Doctor of Medical Sciences,

Senior scientific worker, laboratory of clinical immunology,

Yanovsky National Institute Phthysiology and pulmonology NAMS of Ukraine,

st. Amosova, 10, Kyiv, Ukraine, 03038,

e-mail: ilyinskaya@ukr.net

Asthma and Allergy, 2020, 3, P. 55–64.

ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕКСАМЕТАЗОНОМ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЕЕ КОНТРОЛИРУЕМОСТЬЮ

И. Ф. Ильинская, Ю. И. Фещенко, Л. М. Курик, Ю. А. Матвиенко, Л. В. Арефьева

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев, Украина

Резюме. Целью данного исследования было изучение особенностей индуцированного дексаметазоном апоптоза лимфоцитов (Лф) периферической крови у больных бронхиальной астмой (БА) с ее контролируемым и неконтролируемым течением. *Материалы и методы исследований.* Было обследовано 54 пациента, в т. ч. 22 лица с контролируемой БА и 32 больных с неконтролируемой БА. Контрольную группу было сформировано из 11 волонтеров — лиц без клинических признаков инфекционной и соматической патологии (условно здоровых). Определение апоптоза Лф, индуцированного дексаметазоном, проводили путем 48 часовой инкубации гепаринизированной крови в питательной среде RPMI с L-глутамином, HEPES (GIBCO) и гентамицином в присутствии 0,4 мкг / мл и 4,0 мкг / мл дексаметазона и T-клеточного митогена — фитогемагглютинаина, которым осуществляли

активацию Лф. Детекцию апоптических Лф проводили их окрашиванием Аннексином-5, конъюгированным с флуоресцеина изотиоцианатом, и 7-амино-Актиномицином-D с последующей цитометрией проб. Определяли процент Лф с ранними, с ранними и поздними признаками апоптоза, суммарные показатели раннего и позднего апоптоза и интегральный показатель апоптоза Лф. Также рассчитывали частоту и выраженность изменений этих показателей (повышение / снижение). Для изучения зависимости апоптоза Лф от дозы дексаметазона, оценивали соотношение показателей апоптоза Лф при его индукции 4,0 мкг/мл и 0,4 мкг/мл дексаметазона, и при соотношении $> 1,0$ определяли усиление индукции апоптоза Лф, а при соотношении $> 1,0$ определяли отсутствие / ослабление индукции апоптоза Лф при увеличении терапевтической дозы дексаметазона. *Результаты.* Было выявлено повышение в 2,8 раза среднего значения интегрального показателя индуцированного дексаметазоном апоптоза Лф в группе больных с контролируемой БА преимущественно за счет его ранних этапов и отсутствие этих изменений в группе больных с неконтролируемым течением болезни. Продемонстрировано, что адаптационное усиление апоптоза Лф, индуцированного терапевтической дозой дексаметазона (0,4 мкг / мл) происходило у 54,5 % больных с контролируемой БА в среднем на 151,9 %, тогда как при неконтролируемой БА оно имело место только у 31,3 % больных, а его выраженность была в 2,6 раза меньшей (58,8 %). Установлено, что отсутствие усиления апоптоза Лф, индуцированного данной дозой дексаметазона, было обнаружено у 45,5 % больных с контролируемой БА и у 69,7 % больных с ее неконтролируемым течением, что может свидетельствовать о наличии у них стероидорезистентности. Установлено, что 10-кратное увеличение терапевтической дозы дексаметазона у 72,7 % больных с контролируемой БА не сопровождается усилением апоптоза Лф, что может говорить о том, что они получают максимально эффективные дозы ГКС, и поэтому их дальнейшее увеличение не является целесообразным. В то же время почти 2/3 больных с неконтролируемой БА демонстрируют повышение апоптоза Лф при увеличении дозы ГКС для его индукции, что характерно для стероидочувствительных и стероидозависимых пациентов. *Выводы.* У каждого третьего больного с неконтролируемой БА увеличение дозы ГКС не влечет усиления апоптоза Лф, что может свидетельствовать о стероидорезистентности и считаться показанием к назначению таргетных препаратов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, контролируемость, индуцированный дексаметазоном апоптоз лимфоцитов.

И. Ф. Ильинская
старший научный сотрудник, доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии,
ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии
им. Ф. Г. Яновского Национальной академии медицинских наук Украины»,
ул. Амосова, 10, г. Киев, Украина, 03038,
e-mail: ilyinskaya@ukr.net
Астма и Аллергия, 2020, № 3, С. 55–64.

ЛИТЕРАТУРА

1. Diagnosis and management of difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients. GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// gina sthma.org/gina-ebooks](https://gina.sthma.org/gina-ebooks) (дата звернення 10.08.2019).
2. Фещенко ЮІ, Ільїнська ІФ, Ареф'єва ЛВ, Курик ЛМ. Неконтрольована бронхіальна астма: сучасний стан проблеми. Астма та алергія. 2018;2:20–25. doi: 10.31655/2307-3373-2018-2-20-25.
3. Белоцерковская ЮГ, Романовских АГ, Смирнов ИП, Стырт ЕА. Неконтролируемая бронхиальная астма: что за этим скрывается? Клиническая медицина. 2018;6:485–490.
4. Позднякова ОЮ. Клинико-фенотипическая характеристика неконтролируемой бронхиальной астмы и персонализированный подход к диагностике и лечению в амбулаторно-поликлинических условиях: дис. ... докт. мед. наук., Ставрополь. 2016. 305 с. : URL: <https://doi.org/10.1080/02770903.2017.132458> (дата звернення: 09.05.2019).
5. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. Nat Rev Immunol. 2017;17(4):233–247. doi:10.1038/nri.2017.1.
6. Ярилин АА, Никонова МФ, Ярилина АА, Варфоломеева МИ, Григорьева ТЮ. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных. Медицинская иммунология. 2000;2(1):7–16.
7. Барышников АЮ, Шижкин ЮВ. Иммунологические проблемы апоптоза. Москва: Эдиториал УРСС; 2002. 320 с.
8. Ільїнська ІФ. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді (аналітичний огляд). Лаб. діагностика. 2002;3:66–72.
9. Нестерович ИИ. Нарушения апоптоза клеток-мишеней при различных вариантах бронхиальной астмы: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.43. Санкт-Петербург. 2005. 292 с. URL: [#\(дата звернення 06.10.2019\)](#).

REFERENCES

1. Diagnosis and management of difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients. GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// gina sthma.org/gina-ebooks](https://gina.sthma.org/gina-ebooks) (last accessed 10.08.2019).
2. Feshchenko Yul, Ilyinska IF, Arefieva LV, Kurik LM. Nekontrollovana bronhialna astma: suchasniy stan problemi (Uncontrolled bronchial asthma: the current state of the problem). Astma and allergy. 2018;2:20–25. doi: 10.31655/2307-3373-2018-2-20-25.
3. Belotserkovskaya YuG, Romanovskikh AG, Smirnov IP, Styrt YeA. Nekontroliruyemaya bronhial'naya astma: chto za etim skryvayetsya (Uncontrolled bronchial asthma: what is behind it?)? Klinicheskaya meditsina. 2018;6:485–490.
4. Pozdnyakova OY. Kliniko-fenotipicheskaya kharakteristika nekontroliruyemoy bronkhial'noy astmy i personalizirovanny podkhod k diagnostike i lecheniyu v ambulatorno-poliklinicheskikh usloviyakh (Clinical and phenotypic characteristics of uncontrolled bronchial asthma and a personalized approach to diagnosis and treatment in an outpatient setting): dis. ... dokt. med. nauk., Stavropol'. 2016. 305 s. : URL: <https://doi.org/10.1080/02770903.2017.132458> (last accessed: 09.05.2019).
5. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. Nat Rev Immunol. 2017;17(4):233–247. doi:10.1038/nri.2017.1.
6. Yarilin AA, Nikonova MF, Yarilina AA, Varfolomeyeva MI, Grigor'yeva TYu. Apoptoz, rol' v patologii i znachimost' yego otsenki pri kliniko-immunologicheskoy obsledovanii bol'nykh (Apoptosis, its role in pathology and the significance of its assessment during clinical and immunological examination of patients). Meditsinskaya immunologiya. 2000;2(1):7–16.
7. Baryshnikov AY, Shishkin YV. Immunologicheskiye problemy apotoza (Immunological problems of apoptosis). Moscow: Editorial URSS; 2002. 320 p.
8. Ільїнська ІФ. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді (аналітичний

10. Скибо ЮВ, Курмаева НШ. Особенности апоптоза лимфоцитов у больных легкой и тяжелой atopической бронхиальной астмой. Практическая медицина. 2012;61(6):62–68. URL: <http://en.pmarchive.ru/osobennosti-apoptoza-limfocitov-u-bolnykh-legkoj-i-tyazhelej-atopicheskoy-bronxialnoj-astmoj> (дата звернення 06.10.2019).
11. Мамонтова ТВ. Атопическая бронхиальная астма и устойчивость к апоптозу. Актуальные проблемы современной медицины. 2008;8(4):171. URL: <http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/1751> (дата звернення 10.10.2019).
12. Паракхонский АП, Егорова СВ, Цыганок СС. Механизмы программируемой гибели клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой. Успехи современного естествознания. 2008;8:107–108. URL: 658471 <http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/175144> (дата звернення: 18.10.2019).
13. Водунон Сирил Джуниор Алоде. Особенности апоптоза лимфоцитов при atopической бронхиальной астме: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. Казань. 2008. 157 с. URL: <https://www.disscat.com/content/osobennosti-apoptoza-limfocitov-pri-atopicheskoy-bronxialnoj-astme> (дата звернення 18.10.2019).
14. Global Initiative for Asthma. Workshop Report, 2014. URL: <http://www.ginasthma.com/download.asp?intId=217> (дата звернення 04.04.2019).
15. Наказ МОЗ України від 08.10.2013 № 868 "Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі". Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Бронхіальна астма». Київ: МОЗ України; 2013. 54 с.
16. Ткач АВ, Иванова ЛА, Стеценко ЮВ. Методы обнаружения и количественной оценки апоптоза (обзор литературы). Медицина труда и промышленная экология. 2008;12:28–35. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12196179> (дата звернення 03.09.2019).
17. Войткова ВВ. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии. Вестник ВСНЦ СО РАМН. 2010;76(6):220–225. URL: <https://cyberleninka.ru/article/v/izuchenie-apoptoza-metodom-protocnoy-tsitofluorimetrii-obzor-literatury> (дата звернення 28.07.2020).
18. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: МОРИОН; 2000. 320 с.
- ohlyad) (Apoptosis, apocytosis and their role in the immune response (analytical review)). Lab diagnostics. 2002;3:66–72.
9. Nesterovich II. Narusheniya apoptoza kletok-misheney pri razlichnykh variantakh bronxial'noy astmy (Violations of apoptosis of target cells in various variants of bronchial asthma): dis. ... d-ra med. nauk: 14.00.43. St. Petersburg. 2005. 292 p. URL: <https://www.disscat.com/content/narusheniya-apoptoza-kletok-misheney-pri-razlichnykh-variantakh-bronxialnoi-astmy> (last accessed 06.10.2019).
10. Skibo YV, Kurmayeva NS. Osobennosti apoptoza limfocitov u bol'nykh legkoy i tyazhelej atopicheskoy bronxial'noy astmoy (Features of lymphocyte apoptosis in patients with mild and severe atopical bronchial asthma). Practical medicine. 2012;61(6):62–68. URL: <http://en.pmarchive.ru/osobennosti-apoptoza-limfocitov-u-bolnykh-legkoj-i-tyazhelej-atopicheskoy-bronxialnoj-astmoj> (last accessed 06.10.2019).
11. Mamontova TV. Atopicheskaya bronxial'naya astma i ustoychivost k apoptozu (Atopic bronchial asthma and resistance to apoptosis). Actual problems of modern medicine. 2008;8(4):171. URL: <http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/1751> (last accessed 10.10.2019).
12. Parakhonskiy AP, Yegorova SV, Tsyganok SS. Mekhanizmy programmirovemoy gibeli kletok perifericheskoy krovi u bolnykh bronxial'noy astmoy (The mechanisms of programmed death of peripheral blood cells in patients with bronchial asthma). The successes of modern science. 2008;8:107–108. URL: 658471 <http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/175144> (data zvernennya: 18.10.2019).
13. Vodunon Siril Dzhunior Alode. Osobennosti apoptoza limfocitov pri atopicheskoy bronxial'noy astme (Features of apoptosis of lymphocytes in atopical bronchial asthma): dis. ... cand. biol. Sciences: 03.00.04): dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.04. Kazan. 2008. 157 p. URL: <https://www.disscat.com/content/osobennosti-apoptoza-limfocitov-pri-atopicheskoy-bronxialnoj-astme> (last accessed 18.10.2019).
14. Global Initiative for Asthma. Workshop Report, 2014. URL: <http://www.ginasthma.com/download.asp?intId=217> (last accessed 04.04.2019).
15. Nakaz MOZ Ukraini vid 08.10.2013 № 868 "Pro zatverdzhennya ta vprovadzhennya mediko-tehnologichnih dokumentiv zi standartizatsii medichnoi dopomogi pri bronhial'niy astmi. Unifikovaniy klinichniy protokol pervinnoi, vtorinnoi (spetsializovanoi) medichnoi dopomogi «Bronhialna astma» (Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 08.10.2013 № 868 "On Approval and Implementation of Medical-Technological Documents for the Standardization of Medical Aid in Bronchial Asthma". Unified clinical protocol for primary, secondary (specialized) medical care "Bronchial asthma"). Київ: MOZ Ukraini. 2013;54.
16. Tkach AV, Ivanova LA, Stetsenko YV. Metody obnaruzheniya i kolichestvennoy otsenki apoptoza (obzor literatury) (Methods of detection and quantification of apoptosis (literature review)). Occupational medicine and industrial ecology. 2008;12:28–35. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12196179> (last accessed 03.09.2019).
17. Voytkova VV. Izucheniyе apoptoza metodom protocnoy tsitofluorimetrii (The study of apoptosis by flow cytometry). Bulletin of the VSNS SB RAMS. 2010;76(6):220–225. URL: <https://cyberleninka.ru/article/v/izuchenie-apoptoza-metodom-protocnoy-tsitofluorimetrii-obzor-literatury> (last accessed 28.07.2020).
18. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyah s ispolzovaniem Excel (Statistical methods in biomedical research using Excel). K.: MORION. 2000;320.

Надійшла до редакції: 20.07.2020 р.

Прийнято до друку: 10.08.2020 р.

И. Ф. Ильинская

ORCID ID

<https://orcid.org/0000-0001-8300-1567>

Ю. І. Фещенко

ORCID ID

<https://orcid.org/0000-0002-8933-8811>

Л. М. Курик

ORCID ID

<https://orcid.org/0000-0001-7873-8951>

Ю. О. Матвієнко

ORCID ID

<https://orcid.org/0000-0002-8539-8999>

Л. В. Арефьева

ORCID ID

<https://orcid.org/0000-0002-8171-0738>