

УДК 575.224.22:616.248:616.9

А.Ю. АКПАРОВА, Т.Е. ЕЩЖАНОВ,  
А.К.БАЙГЕНЖИН\*, Р.И.БЕРСИМБАЙ

## РОЛЬ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В РАЗВИТИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Проведено исследование маркеров апоптоза у больных бронхиальной астмой. В сыворотке крови больных обнаружен высокий уровень белка bcl-2 и наряду с этим, низкая концентрация p53 и sFASL. Напротив, в сыворотке крови здоровых пациентов установлено высокое содержание белков – продуктов генов-агонистов апоптоза (p53 и sFASL), при этом уровень белка гена с антиапоптотическим эффектом (bcl-2) был минимально низким. Установлена зависимость концентрации указанных белков от степени тяжести заболевания, объема проводимой терапии и иммунологических показателей.

Апоптоз или программируемая клеточная гибель, обеспечивает гомеостаз организма за счет элиминации активированных иммунокомпетентных клеток, участвовавших в процессах воспаления и выполнивших свои функции. По современным представлениям баланс внутриклеточных и внеклеточных факторов определяет пребывание клеток в состоянии покоя, пролиферации, дифференцировки или на пути к смерти. В последние годы активно изучается роль апоптотического механизма иммуносупрессии в патогенезе бронхиальной астмы (БА) [1].

Нарушение апоптоза иммунокомпетентных клеток при бронхиальной астме обусловлено увеличением активности генов как внешних модуляторов апоптоза (ИЛ-5) в очаге воспаления, так и внутриклеточным эффекторам апоптоза, к которым относятprotoонкогены bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bak. Ключевым регулятором пролиферативной и апоптотической активности в клетке является продукт гена p53, который относится к транскрипционным факторам и способен активировать проапоптотические гены, а также способен подавлять активность антиапоптотических эффекторов [2, 3, 4, 5].

Ранее апоптоз при бронхиальной астме в основном изучался по определению клеточного рецептора CD95(FAS), по которому судят об активации иммунокомпетентных клеток, их готовности к Fas-индуцированному апоптозу [6, 7]. Fas/CD95 содержит в цитоплазматическом участке «домен смерти», обеспечивающий активацию каскада каспаз [8]. Лиганды служат основными индукторами сигнала к запуску апоптоза иммунных клеток. Лигандом для FAS является

FAS-L (APO-1L, он же CD178). Растворимые формы рецепторов и лигандов (s-формы) поверхности мембранных молекул иммунокомпетентных клеток обладают иммунорегуляторными свойствами, а их уровни отражают процессы активации и элиминации клеток иммунной системы и могут служить маркерами патологического процесса [1, 9, 10]. При активации клеток в наибольшей степени CD95 экспрессируется на нейтрофилах, гепатоцитах, Т-лимфоцитах CD4+, что характеризует их высокую чувствительность к FasL-индуцированному апоптозу (например, при инфекционных процессах) [8].

По данным литературы в биоптатах бронхов больных БА количество апоптотически измененных эозинофилов и макрофагов меньше, чем у больных хроническим бронхитом (ХБ) и здоровых, и прогрессивно уменьшается с нарастанием тяжести астмы [11]. Одной из причин выживаемости эффекторных клеток при БА является активация генов семейства bcl-2 [12]. Было выявлено, что экспрессия белка bcl-2 выше в биоптатах больных БА, чем у здоровых и больных ХБ, что коррелирует с тяжестью заболевания, количеством интактных Т-лимфоцитов и превышает активность белка p53 [11].

Накопление p53 происходит при повреждении ДНК и носит характер «стража генома», поскольку при общирном повреждении ДНК p53 вызывает апоптоз. Включение внутриклеточной программы гибели клетки происходит при повышенной количественной экспрессии p53 [12].

Целью данного исследования явилось изучение содержания белков-продуктов генов апоптоза (bcl-2, p53, sFASL) у больных БА в зависи-

Таблица 1. Содержание сывороточных маркеров апоптоза p53, sFAS-L и bcl-2 у больных БА

Группы обследованных больных	P53 (U/ml)	Bcl-2 (U/ml)	sFAS-L (U/ml)
Легкая персистирующая астма (n=10)	2,3±0,03	1,2±0,01	0,20±0,04
Среднетяжелая астма (n=10)	1,7±0,01*	1,8±0,04	0,17±0,01
Тяжелая астма (n=10)	1,56±0,02*	2,5±0,03*	0,15±0,01*
Контрольная группа (n=10)	3,13±0,01	1,1±0,01	0,23±0,01

Примечание. \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем

ности от тяжести течения заболевания и иммунологических показателей.

### Материалы и методы

Сывороточные маркеры апоптоза были изучены у 30 больных бронхиальной астмой, находившихся на лечении в пульмонологическом отделении Онкологического диспансера г. Астаны, из них 11 мужчин и 19 женщин. Средний возраст больных составил 38 лет. Обследование включало в себя сбор анамнеза, клинический осмотр, общепринятые и специальные лабораторные методы исследования. Степень тяжести бронхиальной астмы определяли в соответствии с международными стандартами (GINA, 2009). У 10 больных (33,3%) была легкая персистирующая астма, у 10 больных – средней степени тяжести (33,3%) и у 10 больных – тяжелая астма (33,3%). Результаты сравнивали с контрольной группой из 10 практически здоровых лиц в возрасте от 18 до 45 лет.

Для оценки иммунологических изменений забор крови производился в количестве 5 мл, антикоагулянт – гепарин. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколл – верографин  $\rho = 1,077$  г/мл. Субпопуляционный анализ лимфоцитов проводили методом непрямой мембранный иммунофлюоресценции с применением панели моноклональных антител к поверхностным антигенам лимфоцитов: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD56+, а также HLA-DR+ с учетом результатов на проточном цитофлюорометре Cytomics FC-500 фирмы Beckman Coulter.

Определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов A, M, G и E проводилось иммуноферментным методом. Функцию фагоцитов оценивали в НСТ-тесте в спонтанном варианте (ЛПС *E. Coli*).

Концентрацию в сыворотке крови растворимого FAS лиганды (sFASL), апоптозных белков

bcl-2 и p53 определяли посредством иммуноферментного энзим-связанного иммunoсорбентного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов «Human p53 ELISA», «Human Bcl-2 ELISA», «Human sFAS-L ELISA» (Bender MedSystems GmbH, Austria). Интенсивность окраски, свидетельствующую о концентрации определяемых белков, измеряли с помощью Microplate Reader (BiolabSystem) при длине волны 450 нм. Концентрации bcl-2, p53 и sFasL определяли по стандартным кривым, построенным на основе готовых белковых препаратов bcl-2, p53 и sFasL.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами и цифрами считали достоверными при  $p<0,05-0,01-0,001$ .

### Результаты и их обсуждение

В сыворотке крови больных бронхиальной астмой средней и тяжелой степени тяжести был обнаружен высокий уровень белка-продукта гена bcl-2 и низкая концентрация белков p53 и sFASL по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Причем прослеживалась зависимость концентрации этих белков от характера воспалительного процесса (эозинофильного или нейтрофильного) и степени тяжести заболевания.

По содержанию сывороточных белковых маркеров апоптоза больных БА можно было разделить на две группы: группа 1 – с повышенной активацией апоптоза иммунных клеток и группа 2 – с пониженной апоптотической активностью. Первая группа характеризовалась высокими значениями проапоптотических белков – p53, sFASL и низким содержанием антиапоптотического белка bcl-2, а вторая группа, наоборот, имела низкие значения p53, sFASL и высокие – bcl-2 (табл. 1).

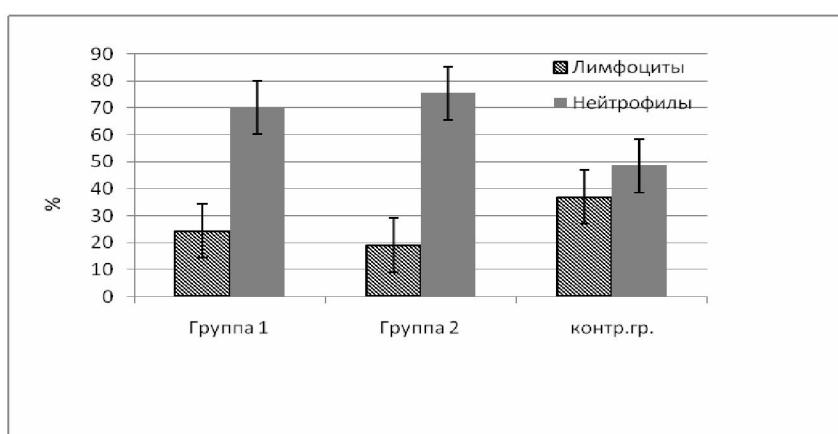


Рис. 1. Содержание лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови у больных БА в зависимости от уровня белков-продуктов генов апоптоза (Bcl-2, P53 и sFASL)

Количественный анализ лимфоцитов и нейтрофилов показал, что в обеих группах содержание нейтрофилов выше по сравнению с контролем (рис. 1).

В группе 2 (низкие значения sFAS-L, p53 и высокие bcl-2) наблюдалась более тяжелая клиническая картина с большей потребностью в

назначении глюкокортикоидных препаратов и антибактериальных средств (табл. 2 и табл. 3).

Независимо от тяжести и этиологии заболевания воспаление присутствует у всех пациентов с бронхиальной астмой и всем им назначаются ингаляционные глюкокортикоиды (ИГКС), действие которых направлено на подавление ал-

Таблица 2. Клинические проявления бронхиальной астмы в зависимости от уровня сывороточных маркеров апоптоза

Клинические данные	n=12		n=14	
	Группа 1		Группа 2	
	абс.	%	абс.	%
Экспираторная одышка в покое	2	16,7	7	50
Экспираторная одышка при минимальном физическом напряжении	1	8,3	5	35,7
Участие вспомогательной мускулатуры в акте дыхания	2	16,7	7	50
Кашель сухой приступообразный	4	33,3	5	35,7
Влажный кашель	3	25	5	35,7
Цианоз носогубного треугольника	1	8,3	2	14,3
Эмфизематозная грудная клетка			3	21,4
Коробочный перкуторный звук	2	16,7	5	35,7
Дистантные хрипы	3	25	7	50
Свистящие хрипы	3	25	7	50
Влажные двусторонние мелко и средние пузырчатые хрипы			2	14,3
Ослабленное дыхание	2	16,7	4	28,6
Бронхопневмония			2	14,3
Повышение температуры тела			2	14,3

Таблица 3. Медикаментозная терапия бронхиальной астмы в зависимости от уровня сывороточных маркеров апоптоза

Препараты	n=12		n=14	
	Группа 1		Группа 2	
	абс	%	абс	%
ГК эндбронхиально	11	91,7	12	85,7
ГК внутрь или в/в	4	33,3	12	85,7
Бронхолитики (теофиллины, $\beta_2$ -агонисты)	11	91,7	12	85,7
Антибиотики	4	33,3	7	50

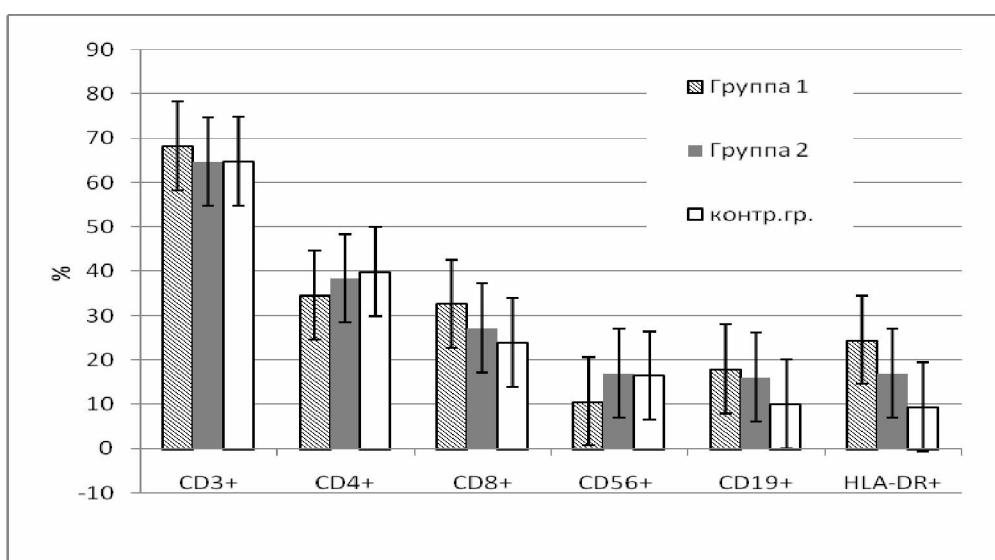


Рис. 2. Относительное содержание основных популяций лимфоцитов у больных БА в зависимости от уровня сывороточных маркеров апоптоза

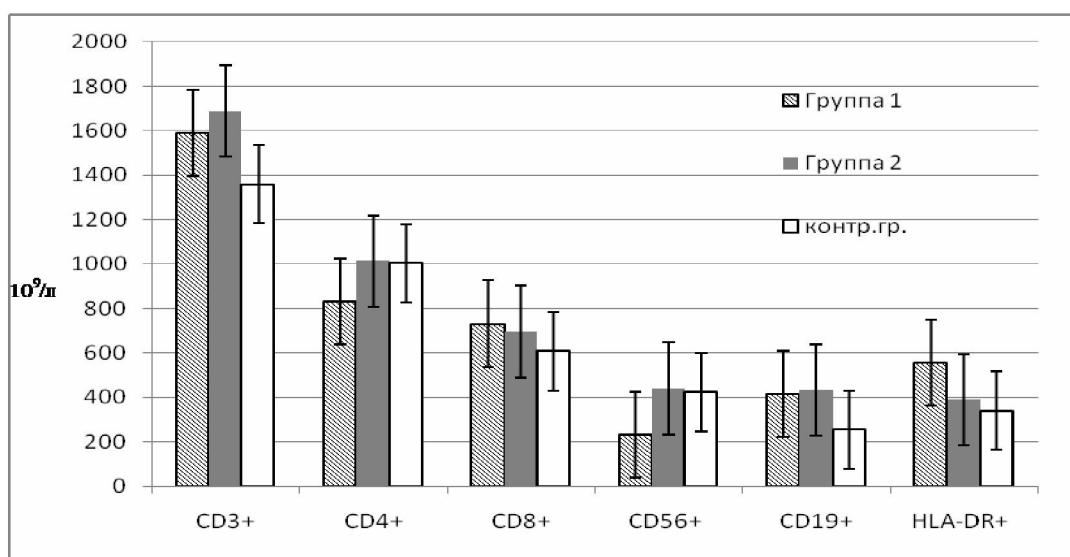


Рис. 3. Абсолютное содержание основных популяций лимфоцитов у больных БА в зависимости от уровня сывороточных маркеров апоптоза

лергического воспаления в дыхательных путях. Потребность в их приеме была у 80% больных. Однако, при назначении ИГКС снижается способность клеток к эрадикации как внеклеточных, так и внутриклеточных патогенов (например, Ch. Pneumonia) [13]. Борьба с инфекционными патогенами требует адекватного иммунного ответа Т-хелперных клеток 1-го типа. ИГКС также могут реактивировать персистирующую инфекцию, которая сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов, а впоследствии создает ус-

ловия для развития воспалительного ответа у пациентов с бронхиальной астмой. Применение кортикоидов приводит к активации каспаз и включаетprotoонкогены, приводящие к активации апоптоза. Например, показано, что дексаметазон индуцирует апоптоз Т-лимфоцитов и повышает концентрацию в плазме растворимой формы Fas у больных аллергической астмой [14]. Другой стероид флютиказон через уменьшение количества Т-лимфоцитов регулирует уровень цитокина – интерлейкина -15 (ИЛ-15) [15]. Та-

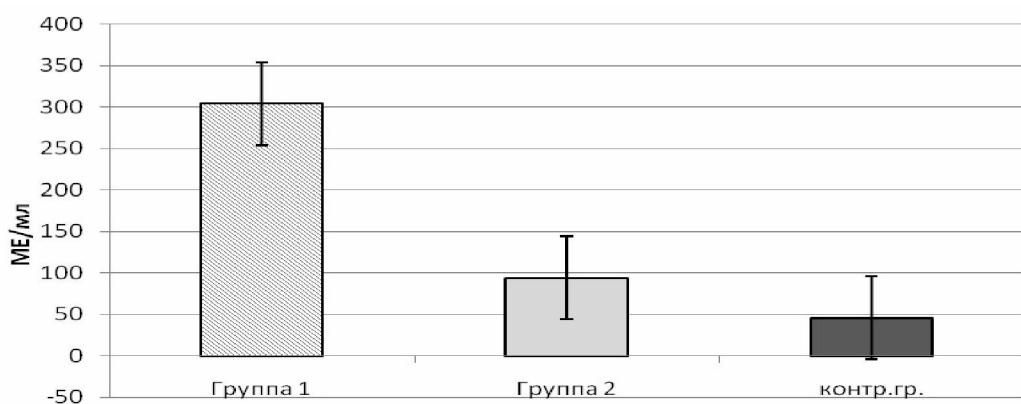


Рис. 4. Содержание IgE в сыворотке крови в зависимости от уровня сывороточных маркеров апоптоза

ким образом, кортикостероиды регулируют воспалительный процесс в дыхательной системе больных бронхиальной астмой и могут стимулировать апоптоз через различные механизмы.

В группе 1 при анализе популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов выявлено достоверное снижение относительных показателей натуральных киллеров (CD56+-клеток), повышение цитотоксических лимфоцитов (CD8+), В-лимфоцитов (CD19+) и HLA-DR+-клеток (активированных клеток) по сравнению с контрольной группой (рисунок 2). При изучении абсолютных значений обнаружено достоверное снижение NK+-клеток, повышение HLA-DR+-клеток и В-лимфоцитов (рис. 2 и рис. 3).

В группе 2 с высоким содержанием bcl-2 и низкими значениями p53, sFAS-L наблюдали достоверное повышение относительных значений HLA-DR+-клеток и абсолютных показателей В-лимфоцитов (рис. 2 и рис. 3).

В группе 1 (низкое содержание bcl-2 и высокое p53, sFAS-L) выявлено достоверно повышенное содержание IgE, свидетельствующее об активации Tx2 иммунного ответа (рис. 4).

Известно, что Tx2-клетки имеют повышенный уровень экспрессии молекул CD30, что считается одним из факторов их большей устойчивости к апоптозу по сравнению с Tx1. В то же время выявлена более высокая способность Tx1 производить FasL. Кроме того, IgE, взаимодействуя с Fc<sup>sR1</sup> на тучных клетках, поддерживает их выживаемость (предотвращает апоптоз) путем индукции эндогенных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-13, ФНОБ) [16].

Таким образом, при изучении сывороточных маркеров апоптоза у больных бронхиальной астмой был обнаружен высокий уровень белка-продукта гена bcl-2 и низкая концентрация белков p53 и sFAS-L у больных средней и тяжелой степени тяжести.

У больных с высоким содержанием bcl-2 и низкими значениями p53, sFAS-L наблюдали более тяжелую клиническую картину с большей потребностью в назначении глюкокортикоидных препаратов и антибактериальных средств, а также достоверное повышение относительных значений HLA-DR+-клеток и абсолютных показателей В-лимфоцитов. У больных БА с низким содержанием bcl-2 и высоким p53, sFAS-L выявлено достоверное снижение относительных и абсолютных показателей натуральных киллеров (CD56+-клеток), повышение В-лимфоцитов (CD19+) и HLA-DR+-клеток, повышение относительных значений цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и общего иммуноглобулина Е.

Изучение апоптоза, как одного из видов клеточной смерти, способствует раскрытию патогенетических механизмов бронхиальной астмы. Оценка уровня сывороточных маркеров апоптоза может быть использована для диагностики тяжести заболевания и назначения адекватной противовоспалительной терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. // Актуальные проблемы патофизиологии, Под ред. Б.Б.Мороза. М.:Медицина. 2001.№3. С.13-56.
- Минеев В.Н., Несторович И.И., Тафеев А.Л. Прояпоптотическое и антиапоптотическое влияние адреналина

- на мононуклеары и гранулоциты периферической крови при бронхиальной астме// Аллергология.-2006.- С.31-36.Швембергер И.Н. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии // Вопросы онкологии. 2002.№2. С.153-157.
3. Bredesen D.E. Apoptosis: overview and signal transduction pathways // J. Neurotrauma. 2000. V.17. №1. P.801-810.
4. Берсимбаев Р.И., Ешжанов Т.Е., Байгенжин А.К. Роль апоптоза иммунных клеток при атопической бронхиальной астме // Доклады НАН РК. 2009г. №5. С. 38-48.
5. Булгакова В.А. Оценка функциональной активности иммунокомпетентных клеток при атопической бронхиальной астме у детей // Иммунология. 2008. №5. С.284-289.
6. Балаболкин И.И., Смирнов И.Е., Булгакова В.А. и др. Современная концепция патогенеза бронхиальной астмы у детей // Иммунология, аллергология, инфектология. 2006. №1. С. 26-35.
7. Потапьев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология.-2002.-№4.- С.237-242.
8. Vandenbergk A., Barnes D., Finn T. et al. Differential susceptibility of human Th1 versus Th2 cells to induction of anergy and apoptosis by ECDI / antigen-coupled antigen-presenting cells. Int. Immunol. 2000. №12(1). P. 57-66.
9. Булгакова В.А. Клиническое значение изучения маркеров активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток при атопической бронхиальной астме у детей// Педиатрия.-2009.Т.87.-№2.- С.12-18.
10. Vignola A.M., Chanez P., Chiappara G., Siena L., Merendino A. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and Tlymphocytes in mucosal biopsies specimens of patients with asthma and chronic bronchitis // J.Allergy Clin. Immunol. 1999. V.103.P.563-573.
11. Невзорова В.А., Суворенко Т.Н., Коновалова Е.Н. Апоптоз и воспаление при бронхиальной астме// Терапевт. Архив. 2001. № 12. С. 92–96.
12. Чучалин А.Г., Оспельникова Т.П., Осипова Г.Л., Лизоуб Н.В., Гервазиева В.Б., Кривицкая В.З., Григорян С.С., Мазуринна С.А., Файзулаев Е.Б., Никонова А.А., Панкратова В.Н., Гончарова С.А. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы// Пульмонология. 2007. №5. С.14-18.
13. Ho C.Y., Wong C.K., Ko F.W. Apoptosis and B-cell lymphoma-2 of peripheral blood T lymphocytes and soluble fas in patients with allergic asthma // Chest. 2002.V.122(5). P.1751-1758.
14. O'Sullivan S., Cormican L., Burke C.M., Poulter L.W. Fluticasone induces T cell apoptosis in the bronchial wall of mild to moderate asthmatics // Thorax. 2004.V.59(8).P.657-661.
15. Дееев И.А., Сазонов А.Э., Огородова Л.М. Молекулярно-генетические механизмы нарушения программируемой гибели эозинофилов при бронхиальной астме у детей // Пульмонология. 2007. №4. С.17-22.

### Резюме

Бронхты астма кезіндегі апоптоз маркерлерінің құрамын зерттеу жүргізілді. Бронхты астмамен ауыратындардың қан сарысында bcl-2 ақуызының жоғары деңгейін, осыған байланысты p53 және sFASL концентрацияларының төмендігі табылды. Керісінше, сау адамның қан сарысында ақуыздың – апоптоз ген-агонисттер өнімдері (p53 және sFASL) құрамының жоғары, соған орай антиапоптоз эффектілігі бар (bcl-2) ген ақуыздың минимальды төмен деңгейі анықталған. Берілген ақуыздар концентрацияларының аурудың ауырлық дәрежесінен, жүргізілген терапия көлемінен және иммунологиялық көрсеткіштерден тәуелділігіне бақылау жүргізілді.

### Summary

Apoptosis markers of patients with bronchial asthma have been studied. High level of bcl-2 serum protein was detected in bronchial asthma patients regarding to this concentration level of p53 and sFASL protein were lower. In contrast high level of apoptosis stimulator gene products (p53 and sFASL) are observed in healthy patients, regarding to that minimal low concentration level of antiapoptotic (bcl-2) protein is detected. According to the given parameters, the degree of illness, the dependence to therapy level and dependence to immunological indications are observed.

Евразийский национальный университет  
им. Л.Н.Гумилева, Астана;

\*Национальный научный  
медицинский центр, Астана      Поступила 01.07.2010 г.