

ЭКСПРЕССИЯ STAT6 В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Минеев В.Н., Сорокина Л.Н.

Кафедра госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Резюме. Цель исследования — изучить экспрессию STAT6, pSTAT6 у больных аллергической (атопической) БА. **Материалы и методы.** Обследовано 5 практически здоровых лиц и 11 больных аллергической (атопической) БА, не получающих глюкокортикостероиды. Применяли методику Western blotting в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) с использованием соответствующих анти-тел: анти-STAT6, анти-pSTAT6 (Cell Signaling). **Результаты.** Выявлено нарастание уровня экспрессии активированного pSTAT6 (фосфорилированная форма) в лимфоцитах периферической крови у больных аллергической БА в фазе обострения. Уровень экспрессии STAT6 в лимфоцитах периферической крови у больных аллергической БА в фазе обострения был достоверно выше, чем в контрольной группе и имел отрицательную корреляционную связь с ОФВ1. **Заключение.** STAT6 и pSTAT6 могут играть важную роль в патогенезе БА. Можно полагать, что обострение БА у пациентов, не получающих глюкокортикостероиды, ассоциировано с выраженным клеточным воспалительным процессом, реализующимся за счет активации STAT6 с возрастанием уровня pSTAT6. Работа поддержана грантом правительства Санкт-Петербурга ПД 04-4.0-102 (Диплом № АСП 604079).

Ключевые слова: бронхиальная астма, JAK-STAT система, STAT6, pSTAT6, лимфоциты.

Mineev V.N., Sorokina L.N.

STAT6 EXPRESSION BY PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA

Abstract. The aim of present study was to determine the features of STAT6 and phospho-STAT6 (pSTAT6) expression in bronchial asthma (BA). **Patients and methods.** Eleven patients with allergic (atopic) steroid-free were examined, five healthy controls served as a control. Expression of proteins (STAT6 and pSTAT6) in peripheral blood lymphocytes was studied by Western blot analysis after cell lysis. Preparation of cell lysates and Western blotting were performed using a standard procedure (Amersham). Antibodies against pSTAT6 and STAT6 (manufactured by Cell Signaling) were used. Relative levels of specific proteins were analyzed using actin as a reference, by means of anti-actin antibody. **Results.** STAT6 phosphorylation was significantly increased in lymphocytes of patients with BA exacerbation, as compared to patients in remission and healthy group. The level of STAT6 was significantly higher compared to healthy persons and showed negative correlation with grade of air flow obstruction. **Conclusion.** STAT6 and their active form pSTAT6 may play a key role in BA pathophysiology. This study suggests atopic, steroid-free BA (in particular, on exacerbation) to be associated with active cellular inflammatory process, involving activation of STAT6, along with increased level of their active form (pSTAT6). The work was supported by Saint-Petersburg government grants: PD04-4.0-102 (Certificate N ASP604079). (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 405-410)

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
198516, Санкт-Петербург-Петродворец,
Санкт-Петербургский пр., 56, кв. 15,
Тел.: 450-71-63, 8-921-359-62-95 (моб.).
E-mail: minvn.spmu.rssi.ru

Введение

Цитокины, как известно, играют ключевую роль в формировании бронхиальной астмы (БА), что принципиально связано с активностью и регуляцией Th2-лимфоцитов. Вполне естественно, что выяснение сигнальных путей, с помощью

которых цитокины осуществляют свои регуляторные функции, находится в центре внимания иммунологов, аллергологов, в частности, астмологов.

Совсем недавно, на рубеже XX и XXI веков, была открыта и к настоящему времени относительно хорошо изучена в эксперименте новая сигнальная система, которая у животных и человека трансдуцирует множество цитокиновых сигналов и ростовых факторов, которые обеспечивают клеточную пролиферацию, дифференциацию, миграцию и апоптоз. Такой принципиально важной системой является JAK-STAT-система (Janus Kinases — Signal Transducer and Activator of Transcription). Достаточно подробно структурно-функциональная организация этой системы, а также особенности изменений этой системы при некоторых видах патологии изложены в целом ряде обзоров [2, 3, 13, 16, 17].

Что касается БА, то данные литературы о функционировании JAK-STAT сигнальной системы в клетках-мишенях при этом виде патологии весьма скудны и разрозненны [15], а в отечественной литературе отсутствуют.

Наблюдаемый при БА сдвиг в сторону Th2-иммунного ответа реализуется, в частности, при активации IL-4 пути сигнализации. После связывания IL-4 и/или IL-13 с трансмембранным рецептором происходит активация с внутренней стороны мембраны Янус-киназ JAK1 и JAK3, которые фосфорилируют STAT6-мономер (неактивный белок), превращая его в pSTAT6-димер (активный белок), который транслируется в ядро, участвуя в транскрипции.

Базируясь на опыте предыдущих исследований других сигнальных систем [1], мы полагаем, что новая сигнальная система JAK-STAT может играть значительную роль в патогенезе БА.

Целью нашего исследования было изучение экспрессии неактивного белка STAT6 и активного белка pSTAT6 и их соотношения у больных аллергической БА в зависимости от фазы заболевания.

Материалы и методы

Работу проводили на базе лаборатории «Внутриклеточной сигнализации и транспорта» (руководитель — академик РАН, профессор Н.Н. Никольский) Научно-исследовательского института Цитологии РАН.

Обследовали 5 практически здоровых лиц и 11 больных аллергической БА, не получающих глюкокортикостероиды (из них 5 больных находились в фазе обострения и 6 — в фазе ремиссии). Все обследованные больные БА находились на лечении в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Чернуцкого Санкт-Петербургского

Государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Всем больным проводилось комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, исследование иммунологического статуса (с оценкой уровня общего иммуноглобулина Е), цитологический и бактериологический анализ мокроты или промывных вод бронхов, а также, по показаниям, бронхоскопическое, аллергологическое и микологическое, гормональные исследования. В каждой обследованной группе проводилось исследование функции внешнего дыхания. В контрольной группе ОФВ1 составил 111,14% от должной; в группе больных аллергической БА ОФВ1 равнялся 68,27% от должной.

Диагноз БА устанавливали в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (Global Initiative of Asthma — GINA, 2005). Комплекс лечебных мероприятий у больных БА полностью соответствовал варианту заболевания. Больные получали медикаментозную терапию в соответствии со стандартами лечения (GINA, 2005).

В качестве модели исследования использовали лимфоциты из периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности с применением стандартной методики выделения моноклеаров на градиенте плотности Lymphoseparation Medium (производство «ICN»), с последующим удалением моноцитов осаждением на пластике в условиях инкубации в CO₂-инкубаторе в течение 40 мин. После окончания инкубации лимфоциты помещали на лед и все дальнейшие процедуры проводили при +4°C. Клетки промывали один раз холодным фосфатно-солевым буфером. Тотальный лизат получали добавлением в чашки 0,1 мл лизирующего буфера, содержащего коктейль из ингибиторов протеаз. Клетки инкубировали в течение 10 мин при +4°C. Затем клеточный лизат центрифугировали 15 мин при 10 000g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб и инкубировали в течение 5 мин при +100°C. Концентрацию белка определяли по методу Bradford (1976), используя овальбумин для построения калибровочной кривой.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS в модификации Laemmli (1970). Концентрирующий гель содержал 4% полиакриламида, разделяющий — 8%. Разделение белков проводили в блоках геля 90 x 60 x 1 мм при силе тока 30 мА на пластину в течение 2 ч. Разделенные в полиакриламидном геле белки перено-

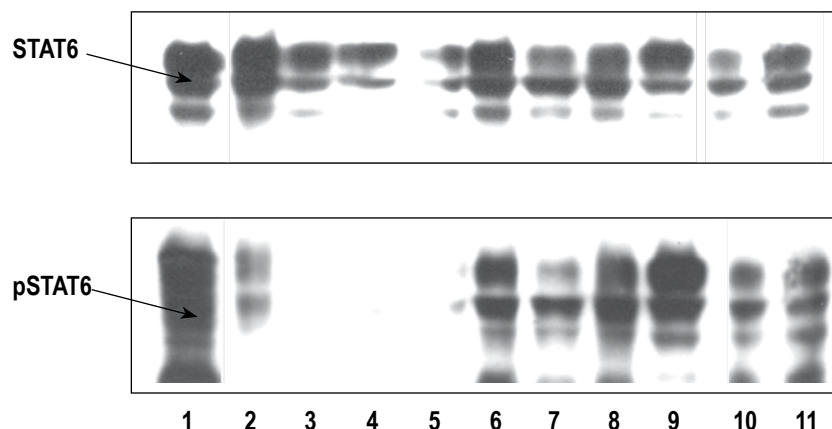


Рисунок 1. Western blotting анализ с использованием антител к STAT6 и pSTAT6 в группе больных БА (нумерация больных приведена в тексте)

сили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Электроперенос проводили при силе тока 0,8 мА на 1 см² геля в течение 1 ч в буфере для полусухого переноса. Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham). Инкубацию с антителами против фосфорилированных по тирозину 641 STAT6 проводили при +4°C. Все остальные процедуры осуществляли при комнатной температуре. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция) (рис. 1 — больные аллергической БА в фазе обострения под цифрами 1, 6, 8, 9, 11; в фазе ремиссии — 2, 3, 4, 5, 7, 10).

Антитела. Для специфического выявления белков использовали поликлональные STAT6 (Cell Signaling Technology, США), моноклональные антитела против фосфотирозина (Cell Signaling Technology, США) и поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированного по тирозину STAT6 (Tyr641) (Cell Signaling Technology, США). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP, Cell Signaling Technology, США); козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой (GAM-HRP, Sigma, CIF).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы «Excel 7» и статистического пакета «Statistica 6» с использованием методов и критериев непараметрической статистики при малом значении n (числа наблюдений): критерия Вилкоксона-Манна-Уитни, коэффициента корреляции Спирмана, и т.д. Заключение о статистической значимости давалось

при уровне вероятности ошибочного заключения не менее 0,05.

Для обработки и анализа полученных данных (с регистрацией интегрированной плотности по стандартной методике) использовали программы Adobe Photoshop CS2 и Scion Image.

Результаты

Результаты исследования представлены в таблице 1. Как видно из таблицы 1, уровень экспрессии STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных БА при обострении заболевания существенно выше по сравнению с уровнем у практически здоровых лиц. В фазе ремиссии этот уровень снижался практически до уровня в контрольной группе.

Наибольшие отличия между группой практически здоровых лиц и больными БА выявлены при исследовании уровня экспрессии pSTAT6, который существенно повышен как при обострении, так и в фазе ремиссии заболевания.

Нами также проведена сравнительная интегральная оценка уровней экспрессии активной (фосфорилированной) pSTAT6 и неактивной STAT6 форм изучаемого транскрипционного фактора (рис. 2).

Из рисунка 2 хорошо видно, что индекс pSTAT6/STAT6 существенно (в 3,7 раза) выше при БА в фазе обострения заболевания по сравнению с практически здоровыми лицами, причем полного восстановления этого соотношения в фазе ремиссии заболевания не происходит, этот индекс pSTAT6/STAT6 у больных БА в фазе ремиссии в 1,7 выше, чем у практически здоровых лиц, хотя эти различия не достоверны.

Следует заметить, что обследованные больные БА характеризовались повышением общего IgE (479,99 IU/mL; 25-75%: 101-647 IU/mL при норме до 120 IU/mL), а также достаточно выраженной эозинофилией (0,518 x 10⁹/L; 25-75%:

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ STAT6 И pSTAT6 (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ, ПРОЦЕНТИЛИ: 25-Й, 75-Й) В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

Обследованные группы		STAT6	Процентили		pSTAT6	Процентили	
			25-й	75-й		25-й	75-й
Контрольная группа		0,486	0,39	0,58	0,126	0,08	0,17
БА	Обострение	0,96*	0,53	1,1	0,928*	0,78	1,04
	Ремиссия	0,552	0,3	0,49	0,263**	0,07	0,44

Примечания: (отмечено $p < 0,05$) * – сравнение с контрольной группой; ** – сравнение с фазой обострения БА

0,39-0,62 $\times 10^9/L$, при норме 0,03-0,048 $\times 10^9/L$, что соответствует 8,05% от общего числа лейкоцитов). В этой связи представляют интерес выявленные нами существенные положительные корреляционные связи между уровнем экспрессии STAT6 и значениями общего иммуноглобулина E ($r = 0,694$; $n = 11$; $p = 0,038$).

Еще одна существенная корреляционная связь выявлена при сравнении такого важного показателя функции внешнего дыхания, как ОФВ1 и уровня экспрессии STAT6 в лимфоцитах периферической крови (рис. 3).

Обсуждение

Полученные к настоящему времени данные, прежде всего экспериментальные, свидетельствуют о том, что JAK-STAT сигнальная система играет ключевую и подчас определяющую роль в цитокиновой сигнализации.

Начатые нами исследования выявили целый ряд интересных и важных фактов, касающихся одного из STAT-белков, STAT6, который являет-

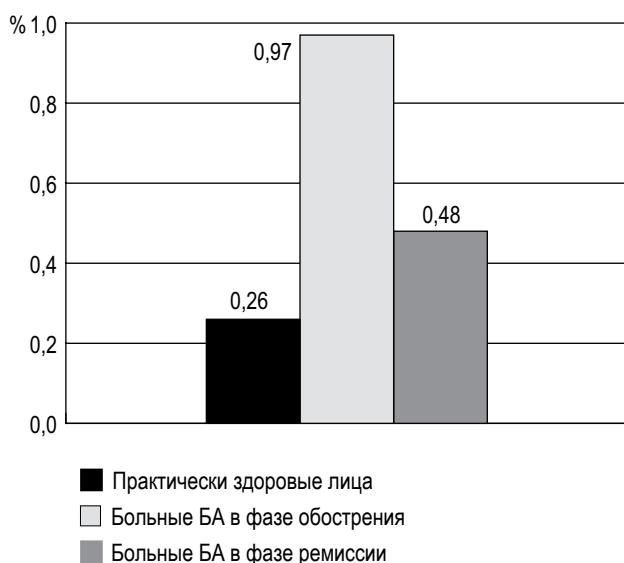
ся «жизненно» важным в формировании и регуляции иммунного ответа при БА [15].

Первый факт касается выявленной нами повышенной экспрессии конститутивной формы STAT6 в лимфоцитах периферической крови, подчеркнем в этой связи, что нами для исследования отобраны больные аллергической (атопической) БА, имеющие в анамнезе указания на наследственный характер патологии. Дополнительно отметим, что важен подбор не только однородной группы больных, но и подбор лиц в контрольную группу. Так, критериями отбора в контрольную группу были: отсутствие в анамнезе какого-либо хронического заболевания, а также клинических признаков какого-либо острого заболевания за последние 6 месяцев; благоприятный наследственный анамнез в отношении аллергических заболеваний, отсутствие указаний на прием каких-либо лекарств в течение последнего месяца.

Думается, что именно отсутствие учета этих критериев, особенно первого из них, не позволило некоторым авторам [11] выявить различия в уровне экспрессии STAT6 в лимфоцитах периферической крови между больными с atopической БА и больными-«неатопиками» (контрольная группа), поступившими в тот же госпиталь, что и больные БА. К сожалению, авторы не раскрывают другие особенности лиц, вошедших в контрольную группу (диагнозы, лечение и т.п.).

Что касается других известных клинических исследований STAT6 при БА, выполненных с использованием биоптатов бронхов, то в них получены данные, свидетельствующие о повышенной экспрессии STAT6 при atopической БА. В одном из этих исследований [5] получены данные о том, что в бронхах (иммуноцитохимическое исследование) больных БА по сравнению с контрольной группой здоровых лиц обнаружено существенно большее количество клеток, экспрессирующих STAT6, причем показано, что это количество выше у больных с atopической по сравнению с неатопической БА.

В другом исследовании [12] выявлена повышенная экспрессия STAT6 в бронхиальном эпителии больных БА. Уровень этой экспрессии был

**Рисунок 2. Индекс pSTAT6/STAT6**

Примечание: значения индекса подчеркнуты; * – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой.

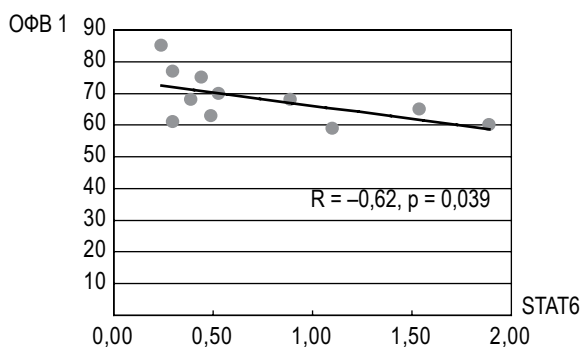


Рисунок 3. Отрицательная корреляционная связь между ОФВ1 и STAT6 в группе больных бронхиальной астмой

выше у больных с тяжелой БА, которые получали ингаляционные и пероральные глюкокортикостероиды.

Еще один важный факт получен нами — повышенная экспрессия pSTAT6 в лимфоцитах периферической крови больных аллергической БА. Экспрессия этой фосфорилированной активной формы связана, по-видимому, с тем клеточным микроокружением и тем цитокиновым профилем, который характерен для больных аллергической БА. Речь идет, прежде всего, об IL-4 и тех клетках, которые его освобождают, в частности, эозинофилах, базофилах и Th2-лимфоцитах [4, 6].

Любопытно, что экспрессия pSTAT6 в лимфоцитах периферической крови остается существенно повышенной (в 2 раза) даже в фазе ремиссии заболевания. Вероятно, именно это объясняет, что индекс pSTAT6/STAT6, который значительно повышен в фазе обострения заболевания, полностью не восстанавливается в фазе ремиссии.

Выявленная нами существенная корреляция уровня экспрессии STAT6 с уровнем общего IgE отражает, по-видимому, роль этого транскрипционного фактора в реализации так называемой IL-4 сигнализации [7]. Как известно, IL-4 является основным цитокином Th2-лимфоцитов [4], именно IL-4, наряду с IL-13, повышает синтез IgE, переключая дифференцировку Th0 в Th2.

Весьма важным фактом является обнаружение нами существенной обратной корреляционной связи между ОФВ1 и уровнем экспрессии STAT6 в лимфоцитах периферической крови. Этот факт не удивителен, учитывая упомянутые выше данные о повышенной экспрессии STAT6 в бронхах [5, 12]. Этот факт может иметь несомненное патогенетическое значение, так как, например, дефицит STAT6 у животных при моделировании БА проявлялся в резком снижении аллергической реакции вплоть до полного ее отсутствия [9, 10].

Начатые нами исследования позволяют предполагать, что в развитии аллергической БА одну из ключевых ролей может играть изменение функционирования одного из компонентов новой сигнальной системы JAK-STAT, а именно: повышение экспрессии STAT6 и его активация (STAT6 → pSTAT6).

Учитывая появившиеся данные о разработке лечебных подходов [14] на основе влияния на компоненты системы JAK-STAT при БА, в частности на STAT6, можно предполагать, что выявленные изменения позволят не только выявить новые патогенетические механизмы, но и создать условия для дальнейшей индивидуализации лечебного подхода.

Учитывая гетерогенность сигнальных систем, в том числе и на уровне транскрипционных факторов, а также важность негативной регуляции внутри отдельных сигнальных систем [18], планируется продолжить как исследования параллельных транскрипционных факторов (в частности STAT4, GATA3), так и компонентов негативной регуляции (SOCS) [8] при БА.

Работа поддержана грантом правительства Санкт-Петербурга ПД 04-4.0-102 (Диплом № АСП 604079)

Благодарность

Выражаем искреннюю благодарность Буровой Е.Б., старшему научному сотруднику, кандидату химических наук, и Василенко К.П., научному сотруднику, кандидату биологических наук, лаборатории «Внутриклеточной сигнализации и транспорта» (руководитель — академик РАН, профессор Н.Н. Никольский) Научно-исследовательского института Цитологии РАН за методическое консультирование и любезно предоставленную возможность работать в лаборатории.

Список литературы

1. Минеев В.Н., Нестерович И.И., Лалаева Т.М., Иванова В.В., Яблонская В.Н., Булатова Н.Ю., Лукашевская Н.Н., Сорокина Л.Н., Рабик Ю.Д., Супранович И.Ю., Волченкова О.С., Болотина Н.В. Сигнальные системы при бронхиальной астме // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. — 2001. — Т. 8, № 1. — С. 17-21.
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии. Часть I // Аллергология. — 2005. — № 4. — С. 38-44.
3. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии: механизмы негативной

регуляции. Часть II // Аллергология. — 2006. — № 1. — С. 49-55.

4. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Иммунологические механизмы аллергических реакций // Общая аллергология / Под ред. Г.Б. Федосеева. — СПб.: Нордмедиздат, 2001. — Т. 1. — С. 169-381.

5. Christodoulouopoulos P., Cameron L., Nakamura Y., Lemi re C., Muro S., Dugas M., Boulet L-P., Laviolette M., Olivenstein R., Hamid Q. Th2-cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression // J. Allergy Clin. Immunol. — 2001. — Vol. 107, N 4. — P. 586-591.

6. Chung K.F., Barnes P.J. Cytokines in asthma // Thorax. — 1999. — Vol. 54. — P. 825-857.

7. Kaplan M.H., Schindler U., Smiley S.T., Grusby M.J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells // Immunity. — 1996. — Vol. 4. — P. 313-319.

8. Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martin H.M., Hilton D.J. The SOCS box: a tale of destruction and degradation // Trends Biochem. Sci. — 2002. — Vol. 27. — P. 235-241.

9. Kuperman D., Schofield B., Wills-Karp M., Grusby M.J. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat-6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production // J. Exp. Med. — 1998. — Vol. 187. — P. 939-948.

10. Losman J.A., Chen X.P., Hilton D., Rothman P. Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction // J. Immunol. — 1999. — Vol. 162. — P. 3770-3774.

11. Miller R.L., Eppinger T.M., McConnell D., Cunningham-Rundles C., Rothman P. Analysis of cytokine signaling in patients with extrinsic asthma and hyperimmunoglobulin E // J. Allergy Clin. Immunol. — 1998. — Vol. 102. — P. 503-511.

12. Mullings, R.E., Wilson S.J., Puddicombe S.M., Lordan J.L., Bucchieri F., Djukanović R., Howarth P.H., Harper S., Holgate S.T., Davies D.E. Signal transducer and activator of transcription 6 (Stat-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium // J. Allergy Clin. Immunol. — 2001. — Vol. 108, N 5. — P. 832-838.

13. Murray P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration // J. Immunol. — 2007. — Vol. 178. — P. 2623-2629.

14. O'Shea J.J., Park H., Pesu M., Borie D., Changelian P. New strategies for immunosuppression: interfering with cytokines by targeting the Jak/Stat pathway // Curr. Opin. Rheumatol. — 2005. — Vol. 17, N 3. — P. 305-311.

15. Pernis A.B., Rothman P.B. JAK-STAT signaling in asthma // J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 109, N 10. — P. 1279-1283.

16. Rawlings J.S., Rosler K.M., Harrison D.A. The JAK-STAT signaling pathway // J. Cell Science. — 2004. — Vol. 117. — P. 1281-1283.

17. Schindler C.W. JAK-STAT signaling in human disease // J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 109. — P. 1133-1137.

18. Shuai K., Liu B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system // Nature. — 2003. — Vol. 3. — P. 900-911.

19. Tomkinson A., Kanehiro A., Rabinovitch N., Joetham A., Cieslewicz G., Gelfand E.W. The failure of STAT6-deficient mice to develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5 // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1999. — Vol. 160. — P. 1283-1291.

поступила в редакцию 21.03.2007

принята к печати 08.04.2007