

# ИНТЕНСИВНОСТЬ ТИМОПОЭЗА У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Блинова Е.А., Непомнящих В.М., Кожевников В.С.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

**Резюме.** Резюме. В настоящей работе исследовали функциональную активность тимуса у доноров и пациентов с различной формой бронхиальной астмы с помощью методики определения количества TREC-позитивных Т-клеток. Несмотря на известные нарушения показателей Т-клеточного гомеостаза, группа пациентов с бронхиальной астмой достоверно не отличалась от группы доноров по уровню TREC в CD4<sup>+</sup> и в CD8<sup>+</sup> лимфоцитах. Также не было выявлено достоверных различий по количеству TREC-содержащих клеток в зависимости от формы астмы и уровня IgE. Однако группа пациентов, болеющих от нескольких дней до года, демонстрировала увеличение количества TREC в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитах по сравнению с донорами и группой пациентов с длительностью заболевания больше года и находившихся на базисной терапии с применением глюкокортикостероидов. Возможно, усиление тимопоэза на начальных стадиях заболевания может быть связано с тимусным стромальным лимфопоэтином, который вносит вклад в развитие бронхиальной астмы, и в норме участвует в процессе образования Т-клеток.

*Ключевые слова:* тимопоэз, TREC, Т-лимфоциты, бронхиальная астма.

*Blinova E.A., Nepomniashchikh V.M., Kozhevnikov V.S.*

## THYMOPOIESIS INTENSITY IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA, DEPENDING ON DURATION OF THE DISEASE

**Abstract.** Functional activity of thymus in normal donors and patients with various clinical forms of bronchial asthma was evaluated by means of assessing TREC-positive T-cell numbers. In spite of well-known alterations in parameters of T-cell homeostasis, TREC levels in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes from the patients with asthma did not differ significantly from those in donors. There were also no significant differences in TREC-containing cell numbers, dependent on clinical types of bronchial asthma and IgE levels. However, the patients with a recent disease onset (duration of several days to one year) showed increased TREC positivity in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes, as compared with donors and those patients who underwent basal therapy with glucocorticoids, and during long-term disorder (> 1 year). Enhanced thymopoiesis at initial stages of the disease may be associated with thymic stromal lymphopoietin which contributes to development of bronchial asthma, and normally participates in the process of T cell production. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 163-168)

*Keywords:* thymopoiesis, TREC, T lymphocytes, bronchial asthma.

### Адрес для переписки:

Блинова Елена Андреевна,  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: (383) 228-21-20.  
Факс: (383) 222-70-28.  
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

### Введение

С возрастом происходит старение иммунной системы, которое проявляется в ослаблении резистентности к инфекциям, повышении риска злокачественных новообразований, аутоиммунных процессов. Среди многообразия возраст-

ных изменений в наибольшей степени процесс старения иммунной системы отражается на ее тимусзависимом звене, включающем как сам тимус, где происходит развитие Т-лимфоцитов, так и Т-клетки, участвующие в регуляции иммунных процессов и осуществлении ряда эффекторных функций.

В настоящее время особая роль отводится инволюции тимуса. У животных обнаружены разные маркеры, по экспрессии которых на поверхности можно определить клетки, недавно вышедшие из тимуса; у курицы это  $chT1^+$ , у крыс –  $Thy1^+CD45RC^-RT6^-$  [7, 12]. У человека, не смотря на то, что для наивных  $CD4^+$  лимфоцитов выявлен поверхностный маркер CD31, точно определить количество клеток, недавно мигрировавших из тимуса довольно трудно [11]. Поэтому для оценки тимопоэза используют Т-рецепторные эксцизионные кольца (TREC). Они представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при реаранжировке Т-клеточного рецептора (ТКР), и содержащие определенные константные последовательности, по которым их можно обнаружить [4]. У 70% Т-лимфоцитов человека, несущих  $\alpha\beta$  ТКР, реаранжировка проходит по одним и тем же фрагментам  $\delta Rec$  и  $\psi Ja$  [13]. Считается, что TREC стабильны, не реплицируются в митозе и в процессе деления переходят лишь к одной из дочерних клеток.

При многих иммунопатологических заболеваниях наблюдается изменение показателей Т-клеточного гомеостаза, и механизмы пополнения наивных Т-клеток в этих условиях отличаются от таковых в норме. Последние исследования показывают, что бронхиальная астма (БА) может рассматриваться как заболевание, связанное с перекрестными нарушениями в звеньях не только адаптивного, но и врожденного иммунитета, которые имеют решающее значение для инициации и распространения аллергической иммунной реакции [14]. Центральным звеном в каскаде этой реакции являются Т-лимфоциты, отвечающие на антигенную стимуляцию активацией, пролиферацией и синтезом цитокинов [9]. Было показано, что в лимфоцитах периферической крови у больных БА происходит ускоренное сокращение теломер, и оказывается, что такое сокращение происходит в разных субпопуляциях на разном уровне и в зависимости от клинко-патогенетической формы астмы [1]. Возможно, это связано с изменением количества мигрирующих из тимуса Т-клеток, последующей экспансией олигоклональных Т-клеток на периферии, что в конечном итоге и приводит к укорочению теломер.

Поэтому целью данной работы стало определение количества TREC в популяции Т-лимфоцитов

как показателя функциональной активности тимуса у пациентов с БА и сопоставление ее с таковой у доноров.

## Материалы и методы

В работе было исследовано 28 пациентов с различной формой БА и средним возрастом  $40,7 \pm 12,3$  лет. Все пациенты поступили в стационар аллергологического отделения Клиники иммунопатологии Института клинической иммунологии СО РАМН с обострением и со средней или тяжелой степенью тяжести заболевания.

Поскольку стромальные клетки тимуса утрачивают способность привлекать клетки-предшественники лимфоцитов, поддерживать их дифференцировку, а также пролиферацию при положительной селекции, с возрастом происходит сокращение числа мигрирующих на периферию наивных Т-клеток. Соответственно, количество TREC с возрастом также снижается. Поэтому для группы пациентов была подобрана по возрасту группа доноров в количестве 16 человек со средним возрастом  $40,4 \pm 10,00$  лет.

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. На одну пробу использовали  $2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$  клеток, окрашенных FITC-меченными анти-CD3 и PE-меченными анти-CD4 моноклональными антителами («Сорбент», Москва). Клетки ресуспендировали в 350 мкл забуференного физ. раствора с EDTA,  $NaN_3$  и 1% FCS. Затем МНК сортировали на популяции  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACS Aria (Becton Dickinson, США) с чистотой 95-98%. Из полученных клеток выделяли ДНК набором «Проба-ГС» («ДНК-технология», Москва), и методом PCR в режиме реального времени с помощью специфичных праймеров и меченного флуорофором зонда определяли количество TREC (табл. 1) на приборе IQ Cycler-5 (Bio-Rad, США). В качестве контроля количества вносимой ДНК использовали параллельную реакцию со специфичными праймерами и также меченным флуорофором зондом к гену CCR5. Количество клеток и молекул TREC в образцах определяли по калибровочным прямым, полученным с помощью серии разведений стандарта (Т-вектор pBlu EV со встроенным фрагментом гена CCR5 или TCR $\delta$ ). Помощь в разработке и изготовлении стандартов была оказана Филиппенко М.Л. и Храповым Е.А. (группа фармакогеномики, институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

ТАБЛИЦА 1. ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ В РЕАКЦИИ ПЦР

Мишень	Последовательность		
	5'	3'	
TREC $\delta$ REC- $\psi$ J $\alpha$	CCCTTTCAACCATGCTGACAC		прямой праймер
	GGGTGCAGGTGCSTATGC		обратный праймер
	FAM~TCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACTCCTG-BHQ1		зонд
CCR5	TACCTGCTCAACCTGGCCAT		прямой праймер
	TTCCAAAGTCCCACTGGGC		обратный праймер
	FAM~TTTCCTTCTTACTGTCCCTTCTGGGCTC-BHQ1		зонд

Реакционная смесь для ПЦР в объеме 25 мкл содержала 5 мкл элюата с ДНК, 2 ед. Hot Start Taq ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск). Концентрация dNTP составляла 200 мкм, концентрация праймеров и зонда – 0,2 мкм каждого,  $MgCl_2$  – 3 мм. Режим термоциклирования: 1 цикл – денатурация и активация полимеразы: 3 минуты 95 С, затем амплификация 35 циклов: 20 секунд 95 С, 15 секунд 60 С, 30 секунд 72 С. Последний цикл составлял 10 секунд 15 С.

Уровень IgE определяли с помощью двухслойного (сэндвич) иммуноферментного анализа стандартным набором для определения иммуноглобулина Е (Хема-Медика, Москва) на приборе Multiscan Ascent (ThermoLabsystems, USA) согласно прилагаемой инструкции.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали методы непараметрической статистики (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в формате Медиана с указанием 25 и 75 перцентилей, максимального и минимального значений. Корреляционный анализ проводили методом корреляции Спирмана.

## Результаты

Пациенты с БА по количеству TREC в  $CD4^+$  и в  $CD8^+$  лимфоцитах достоверно не отличались от доноров (рис. 1). Мы выделили 3 группы больных в зависимости от формы астмы: группа с инфекционно-зависимой астмой составила 11 человек, средний возраст  $46 \pm 4,3$  года, с атопической формой – 6 человек,  $31 \pm 4,5$  года и со смешанной формой – 11 человек,  $43 \pm 4,8$  лет. Достоверных различий по количеству TREC-содержащих клеток в зависимости от формы астмы не было выявлено.

Уровень сывороточного IgE был повышен при атопической и смешанной формах бронхиальной

астмы:  $330 \pm 138,7$  МЕ/мл и  $491 \pm 111,4$  МЕ/мл соответственно, тогда как при инфекционно-зависимой форме его уровень составил  $114 \pm 30,3$  МЕ/мл. Достоверные различия в значениях сывороточного IgE наблюдались между инфекционно-зависимой и атопической, а также между инфекционно-зависимой и смешанной формами ( $p < 0,05$ ). При корреляционном анализе не было выявлено взаимосвязи уровня IgE с количеством TREC в  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитах.

Однако, построив зависимость количества TREC от длительности заболевания, мы увидели, что у пациентов, болеющих от нескольких дней до года, уровень TREC существенно превышает таковой у тех, кто болеет от одного года до 12 лет и более (рис. 2). Различия между этими двумя группами больных достоверны (рис. 3). При сопоставлении с группой доноров оказалось, что у больных БА с длительностью заболевания больше года, которые получали базисную тера-

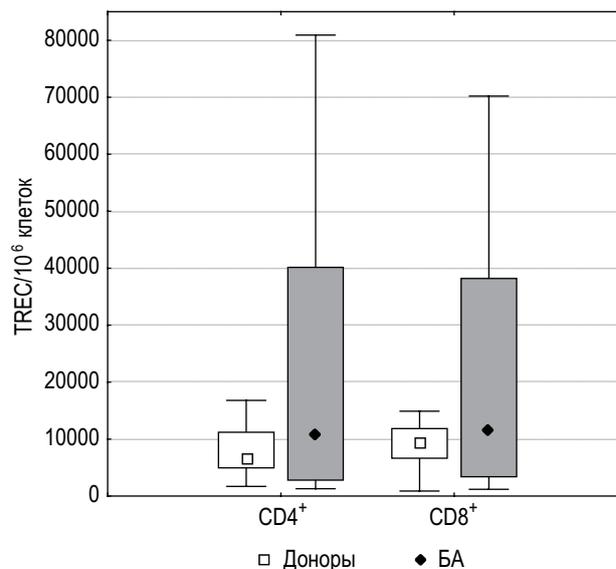
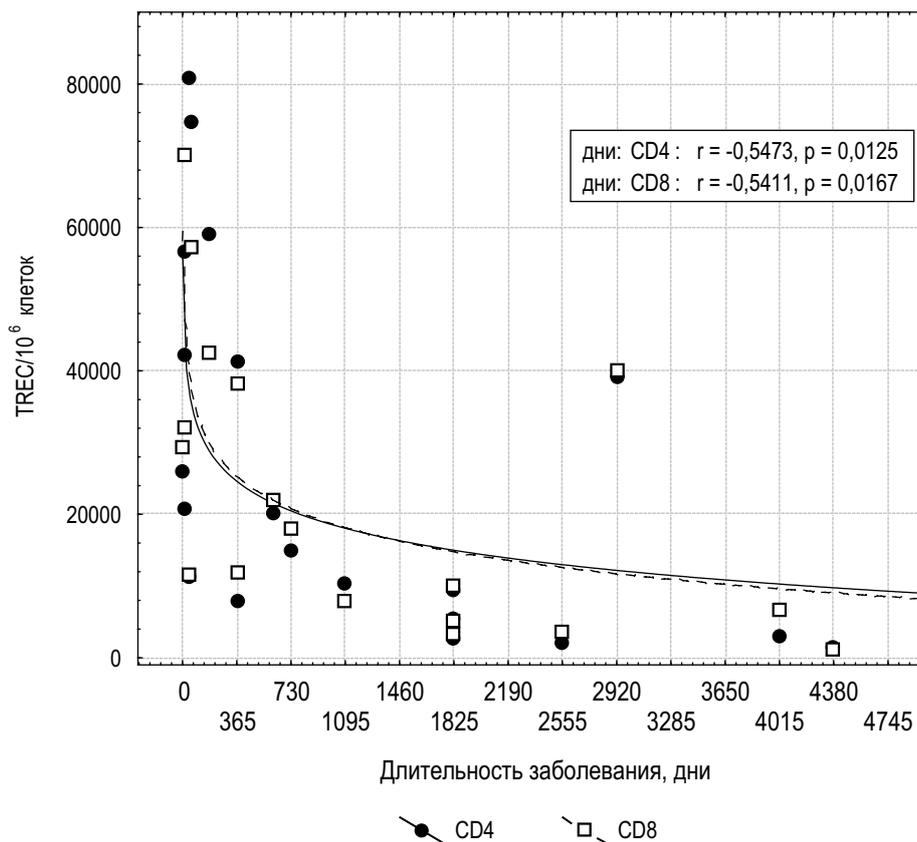
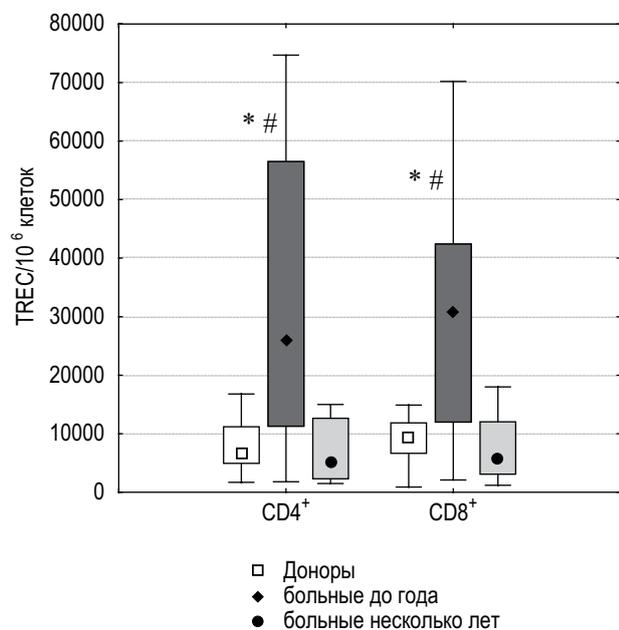


Рисунок 1. Количество TREC в популяциях  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов доноров и пациентов с бронхиальной астмой



**Рисунок 2.** Количество TREC в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в зависимости от длительности заболевания бронхиальной астмой

Примечание.  $r = -0,55, p = 0,013$ ;  $r = -0,54, p = 0,017$ .



**Рисунок 3.** Количество TREC в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у доноров и больных бронхиальной астмой с разной длительностью заболевания

Примечание. Статистическая значимость различий: \* – с группой доноров,  $p < 0,05$ ; # – между группами больных бронхиальной астмой с разной длительностью заболевания,  $p < 0,05$ .

пию и глюкокортикостероиды, количество TREC в CD4<sup>+</sup> и в CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитах не отличалось от такового у доноров. Зато пациенты, болеющие около года, демонстрировали повышенное содержание TREC как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup> лимфоцитах.

### Обсуждение

В большинстве работ, посвященных определению функциональной активности тимуса при различных заболеваниях, показано снижение количества TREC в Т-лимфоцитах. При ревматоидном артрите количество Т-клеток, содержащих TREC, снижено настолько, что у пациентов в 20-30 лет оно соответствует количеству таких клеток у здоровых людей в 50-60 лет. Это связано с нарушением генерации новых Т-клеток, экспансией олигоклональных Т-клеток на периферии, что приводит к укорочению теломер и ускоренному старению популяции Т-лимфоцитов [10]. Низкий уровень TREC выявлен и при таких заболеваниях, как переменный неклассифицируемый иммунодефицит, кожная Т-клеточная лимфома, рассеянный склероз [5, 8, 17]. Однако при ВИЧ-инфекции на ранней стадии наблю-

дается увеличение количества TREC в CD4<sup>+</sup>T-клетках, что можно объяснить как увеличением гибели зрелых CD4<sup>+</sup>T-клеток, так и большей по сравнению со здоровыми донорами продукцией тимуса [15].

В данной работе было обнаружено увеличение количества TREC в популяции Т-лимфоцитов в группе пациентов с БА, болеющих около 1 года. Механизмы и продолжительность сенсибилизации больных БА остаются до сих пор невыясненными, не смотря на то, что были обнаружены различные факторы, влияющие на развитие Т-клеточного ответа на аллерген. К таким факторам относятся генетическая предрасположенность, перенесенные инфекции, атопический статус, возраст, уровень гормонов. Презентация антигена/аллергена приводит на ранней фазе реакции к IgE-опосредованной дегрануляции тучных клеток и последующему сужению гладких мышц дыхательных путей. Поздняя фаза характеризуется привлечением Т-клеток, их активацией и синтезом цитокинов, и в конечном итоге переходит в хроническое воспаление [14]. Вклад в развитие БА вносит тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP) – цитокин, родственник интерлейкину-7. Он конститутивно секретируется эпителиальными клетками тимуса и барьерными тканями. Действуя на свою главную мишень – дендритные клетки, он индуцирует экспрессию мембранной молекулы OX40L. В процессе презентации антигена/аллергена через эту молекулу передается костимулирующий сигнал в CD4<sup>+</sup>T-клетку. Этот сигнал при условии отсутствия интерлейкина-12 вызывает дифференцировку воспалительных Th2-клеток, которые отличаются от обычных Th2-клеток тем, что наряду с типичными Th2-цитокинами они вырабатывают фактор некроза опухоли. Результатом является индукция аллергического воспаления [6].

Кроме того, TSLP участвует в процессе образования Т-клеток, его рецептор экспрессируется на Т-лимфоцитах [6, 16]. Уровень TSLP значительно повышен при БА, возможно, поэтому на начальных стадиях заболевания наблюдается усиление функциональной активности тимуса, и соответственно, увеличение количества TREC-позитивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Показано, что глюкокортикостероиды угнетают экспрессию транскрипционного фактора AP-1 [3], что может приводить к снижению уровня TSLP, и что наряду с другими известными механизмами подавляет тимопоэз [2]. Эти данные могут служить объяснением снижения количества TREC в течение болезни, поскольку пациенты с длительностью заболевания больше одного года находились на базисной терапии с применением глюкокортикостероидов.

## Список литературы

1. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А., Кожевников В.С. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой // Медицинская Иммунология. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 523-530.
2. Cohen J.J. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus // Semin. Immunol. – 1992. – Vol. 6. – P. 363-369.
3. Demoly P, Chanez P, Pujol J.L. Fos immunoreactivity assessment on human normal and pathological bronchial biopsies // Respir. Med. – 1995. – 89. – P. 329-335.
4. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A. Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection // Nature. – 1998. – Vol. 396. – P. 690-695.
5. Gauzzi V., Aiuti F., Mezzaroma I., Mazzetta F., Andolfi G., Mortellaro A., Pierdomonici M., Fantini R., Marziali M., Aiuti A. Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles // Clin. Exp. Immunol. – 2002. – Vol. 192. – P. 346-353.
6. He R. and Geha R.S. Thymic stromal lymphopoietin // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1183. – P. 13-24.
7. Hosseinzadeh H., Goldschneider I. Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues // J. Immunol. – 1993. – Vol. 150, N 5. – P. 1670-1679.
8. Hug A., Korporal M., Schröder I., Haas J., Glatz K., Storch-Hagenlocher B., Wildemann B. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 432-437.
9. Kay A.B. Allergy and allergic diseases – first of two parts // Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344. – P. 30-37.
10. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patient with rheumatoid arthritis // PNAS. – 2000. – Vol. 97, N 16. – P. 9203-9208.
11. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31<sup>+</sup> and CD31<sup>-</sup> human naive CD4<sup>+</sup> T-cell subsets // Blood – 2009. – Vol. 113, N 2. – P. 769-774.
12. Konq F., Chen C.H., Cooper M.D. Thymic function can be monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation // Immunity. – 1998. – Vol. 8, N 1. – P. 97-104.

13. Livak F., Schatz D.G. T-cell receptor  $\alpha$  locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells // Mol. Cell. Biol. – 1996. – Vol. 6, N 2. – P. 609-618.

14. Lloyd C.M., Hessel E.M. Function of T cells in asthma: more than just Th2 cells // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10. – P. 838-848.

15. Nobile M., Correa R., Borghans J.A., D'Aqostino C., Schneider P., De Boer R.J., Pantaleo G. De novo T-cell generation in patients at different ages and stages of HIV-1 disease // Blood. – 2004. – Vol. 104, N 2. – P. 470-477.

16. Rochman I., Watanabe N., Arima K., Liu Y.J., Leonard W.J. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4<sup>+</sup> T cells // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178, N 11. – P. 6720-6724.

17. Yamanaka K-i., Yawalkar N., Jones D.A., Hurwitz D. Decreased T-cell receptor excision circles in cutaneous T-cell lymphoma // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 5748-5754.

*поступила в редакцию 28.07.2011*

*отправлена на доработку 12.10.2011*

*принята к печати 13.10.2011*