

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet В МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Минеев В.Н., Сорокина Л.Н.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург

Резюме. Проведено исследование экспрессии транскрипционного фактора T-bet при аллергической (АБА) и неаллергической (НАБА) бронхиальной астме (БА) в зависимости от тяжести и фазы заболевания. Применяли методику Western blotting в соответствии со стандартным протоколом с использованием соответствующих поликлональных анти-T-bet антител в разведении 1:500 с оценкой уровня белка по β -актину. Впервые показано, что уровень экспрессии T-bet в группе больных АБА при нарастании тяжести течения заболевания и вне зависимости от его фазы снижался по сравнению с группой практически здоровых лиц. У больных НАБА существенных различий экспрессии T-bet по сравнению с группой контроля не выявлено. Исследование поддержано грантом правительства Санкт-Петербурга ПД 04-4.0-102.

Ключевые слова: бронхиальная астма, T-bet, мононуклеарные клетки.

Mineev V.N., Sorokina L.N.

EXPRESSION OF T-bet FACTOR IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN BRONCHIAL ASTHMA

Abstract. We studied expression of transcription factor T-bet protein in allergic (ABA) versus non-allergic bronchial asthma (NABA), depending on severity grade and clinical phase of the disease. A Western blotting technique was applied, according to the standard protocol (Amersham), using polyclonal anti-T-bet antibodies at a 1:500 dilution (Santa Cruz Biotechnology, UK). The protein levels were quantified, using β -actin as a reference. It is shown for the first time that T-bet expression in ABA patients, as compared to healthy controls, was reduced with increasing disease severity, but did not correlate with clinical phase of the disease. In NABA patients, no sufficient differences in T-bet expression were revealed, as compared with healthy controls. The work was supported by St.Petersburg governmental grant PD04-4.0-102 (Certificate № ASP604079). (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 169-173)

Keywords: bronchial asthma, T-bet, mononuclear cells.

Введение

Данное исследование является продолжением цикла работ, посвященных патогенетической

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич,
Кафедра госпитальной терапии им. акад.
М.В. Черноруцкого
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
198516, Санкт-Петербург, Петродворец,
Санкт-Петербургский пр., 56, кв. 15.
Тел.: (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

роли клеточной сигнализации при бронхиальной астме (БА), связанной с JAK-STAT системой, опубликованных в журнале «Медицинская иммунология» [1, 2, 3]. Сравнительно недавно открыт, впервые описан Szabo S.J. et al. в 2000 году [8], транскрипционный фактор T-хелперов 1, T-bet отвечает за дифференцировку наивных T-лимфоцитов в T-хелперы 1-го типа (дословно: белки T-box, экспрессируемые в T-клетках (T-box expressed in T-cells)).

Специфичным является то, что T-bet индуцирует продукцию мощного провоспалительного цитокина IFN γ , являющегося ключевым звеном

в Th1-иммунитете, и угнетает продукцию IL-4 и IL-5 [4]. Показано, что экспрессия T-bet коррелирует с экспрессией IFN γ в Th1-лимфоцитах и в NK (натуральных киллерах) [5, 6, 8].

Предполагается, что изменение уровней транскрипционного фактора T-bet может обусловить патогенетические предпосылки для развития уже в детском возрасте таких аллергических заболеваний, как бронхиальная астма.

Цель исследования – оценить экспрессию транскрипционного фактора T-bet при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в сравнении с группой практически здоровых лиц, в зависимости от тяжести и фазы заболевания. В отечественной литературе подобных данных нет.

Материалы и методы

Было обследовано 97 больных БА, находившихся на лечении в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. В качестве контрольной группы донорами периферической крови явились 21 практически здоровых человека.

Применяли методику Western blotting в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) с использованием соответствующих антител: поликлональные анти-T-bet антитела в разведении 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, UK). В качестве вторичных антител применяли козьи антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1:10000 (GAR-HRP, Cell Signaling Technology, США). Уровень белка определяли по уровню β -актина с использованием соответствующих моноклональных антител в разведении 1:20000 (Sigma Aldrich, США).

Исследование экспрессии белков методом иммуноблоттинга транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови

больных БА проводилось на базе отдела «Внутриклеточной сигнализации и транспорта» Научно-исследовательского института Цитологии РАН, при непосредственном методическом содействии руководителя отдела, академика РАН, профессора, доктора биологических наук Никольского Николая Николаевича и старшего научного сотрудника, кандидата химических наук Буровой Елены Борисовны. Подробно методика описана ранее [1].

Для анализа результатов исследований была разработана специальная база данных на основе программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science for Windows) (русифицированная версия 13.0). Заключение о статистической значимости давалось при уровне вероятности ошибочного заключения не менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки уровней экспрессии транскрипционного фактора T-bet в обследованных группах представлены в таблице 1.

Обратим внимание, что здесь и далее речь идет об анализе уровней экспрессии данного транскрипционного фактора с помощью методики иммуноблоттинга для выявления белка (Western blotting analysis).

Как видно из таблицы 1, у больных АБА выявлено выраженное снижение (в 7,2 раза) уровня экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови по сравнению с контрольной группой (практически здоровых лиц) и группой больных НАБА (в 6,27 раза). В то же время, у больных НАБА существенных различий по сравнению с контрольной группой не выявлено.

Анализируя выявленное снижение экспрессии транскрипционного фактора T-bet у больных АБА, необходимо подчеркнуть, что данный феномен, по-видимому, подтверждает концеп-

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

Группа обследования	Значение*	Достоверность различий**
Контрольная группа (практически здоровые лица) n = 21 (1)	0,8 \pm 0,56	1-2: p = 0,002 1-3: p > 0,05 2-3: p = 0,003
Больные АБА n = 54 (2)	0,11 (0,008; 0,7)	
Больные НАБА n = 43 (3)	0,69 \pm 0,53	

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика); при распределениях, отличающихся от нормального, указаны медиана и 25-75-ый процентиля (непараметрическая статистика); ** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (с применением апостериорного критерия Тьюки); при распределениях, отличающихся от нормального, использован критерий Н независимых выборок Краскала–Уоллеса.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА МЕЖДУ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet В МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БОЛЬНЫХ НАБА

Показатель	n	Коэффициент корреляции*	Знак связи	Достоверность связи
Наличие аспириновой триады (да/нет)	42	0,39	+	p = 0,01
Наличие лекарственной сенсibilизации (да/нет)	42	0,43	+	p = 0,005
Наличие гастроэнтерологической патологии (да/нет)	42	0,36	+	p = 0,018
Относительное количество нейтрофилов (%) в крови	42	0,38	-	p = 0,017

Примечание. * – коэффициент корреляции Пирсона для количественных и коэффициент корреляции Спирмена – для качественных признаков.

цию существования генетически обусловленных биологических дефектов при атопии, определяющих превалирование Th2-иммунного ответа и персистенцию аллергического воспаления при АБА. В этой связи представляются интересными данные литературы, констатирующие снижение экспрессии этого транскрипционного фактора у больных БА [7] в клетках периферической крови.

Как известно, в патогенезе БА могут играть роль, как генетические факторы, так и факторы окружающей среды. Тем более важным звеном представляется адекватная экспрессия IFN γ и связанных с ним транскрипционных факторов в дифференцировке T-клеток. Можно предполагать, что дефектность IFN γ в начале жизни человека способствует сдвигу в сторону Th2-лимфоцитов как за счет повышения продукции IL-6 дендритными или тучными клетками, так и за счет повышения продукции IL-4 натуральными киллерами и другими клетками. Дефект T-bet или его генетическая модификация

у больных БА еще раз подчеркивает роль экспрессии IFN γ в патогенезе этого заболевания.

Отсутствие значимых различий в уровне экспрессии T-bet в мононуклеарах периферической крови у больных НАБА по сравнению с контрольной группой обусловлено, вероятно, комплексом приобретенных факторов, ведущее место среди которых у этой группы больных играют инфекционные агенты, существование очагов хронической инфекции, сопутствующая патология и т.д.

В этой связи интересны полученные нами в результате корреляционного анализа связи, указывающие на гетерогенность этой группы больных (табл. 2).

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet при АБА и НАБА в зависимости от тяжести течения представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, уровень экспрессии транскрипционного фактора T-bet снижается при нарастании тяжести течения АБА. Выявленная динамика может быть связана с применением у больных средней тяжести и тяжелой БА па-

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet ПРИ АБА И НАБА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

Вариант БА	Течение	n	Среднее	Стандартное отклонение	Достоверность различий
АБА	Легкое (1)	23	0,56	0,50	1-2: p = 0,043* 1-3: p = 0,001* 2-3: p > 0,05*
	Средней тяжести (2)	21	0,24	0,3	
	Тяжелое (3)	10	0,1	0,16	
НАБА	Легкое (4)	4	0,45	0,31	4-5: p > 0,05** 4-6: p > 0,05** 5-6: p > 0,05**
	Средней тяжести (5)	20	0,71	0,49	
	Тяжелое (6)	18	0,68	0,53	

Примечание. * – уровень значимости, определяющий достоверность различий (с применением апостериорного критерия Геймса–Хоуэлла); ** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (с применением апостериорного критерия Тьюки).

рентеральных глюкокортикоидов в относительно высоких дозах.

В то же время для НАБА такой динамики не наблюдается: в данной группе больных БА снижение экспрессии исследуемого транскрипционного фактора менее выражено (табл. 3).

При исследовании экспрессии транскрипционного фактора T-bet важным моментом является оценка ее динамики в зависимости от фазы заболевания. Результаты представлены в таблице 4.

При оценке изменения уровня экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови в зависимости от фазы бронхиальной астмы выявлено (табл. 4), что при НАБА, в отличие от АБА, отмечается значимое снижение уровня в фазе ремиссии заболевания по сравнению с обострением.

Анализируя механизмы динамики обострения при НАБА на фоне стационарного лечения, необходимо, на наш взгляд, принимать во внимание более широкое и интенсивное использование в терапии при этом варианте заболевания глюкокортикостероидных препаратов.

Рассмотрим несколько клинических примеров, иллюстрирующих изложенные выше положения.

Больная К., 25 лет (рис. 1). Клинический диагноз: Бронхиальная астма, аллергическая (бытовая, эпидермальная, пищевая, лекарственная сенсibilизация), легкое течение, затихающее обострение. Сопутствующий: Аллергический ринит, постоянная форма, атопический дерматит, вне обострения. Страдает БА в течение 16 лет, дебют заболевания на фоне контакта с аллергеном. Наследственность отягощена бронхиальной астмой и аллергии. При аллергологическом тестировании подтверждено наличие бытовой сенсibilизации. Содержание общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови повышено (460,149 IU/ml), в клиническом анализе крови – умеренная относительная эозинофилия, СОЭ = 7 мм/ч, эозинофилия мокроты. При оценке уровня экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови выявлено харак-

терное для группы больных АБА снижение указанного показателя по сравнению с группой практически здоровых лиц – 0,0056.

Больная М., 47 лет (рис. 2). Клинический диагноз: Бронхиальная астма, неаллергическая (инфекционно-зависимая, нервно-психическая), среднетяжелое течение, фаза обострения. Сопутствующие: Хронический бронхит, фаза обострения. ИБС. Гипертоническая болезнь II ст., риск 3, сахарный диабет, тип 2. Страдает БА в течение 10 лет, дебют заболевания на фоне обострения хронического бронхита. Наследственность по БА не отягощена. В анамнезе был длительный контакт с профессиональными вредностями. Курит в течение 30-ти лет. Имеет аллергические реакции на шерсть кошек, пищевые продукты. В клиническом анализе крови – лейкоцитоз: лейкоциты – $10,5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, увеличение абсолютного числа нейтрофилов – $5,8 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ (при норме до $4,8 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$), относительный лимфоцитоз.

При цитологическом исследовании мокроты выявлен умеренный воспалительный процесс, умеренная эозинофилия, небольшая макрофагальная реакция.

К базисной терапии БА добавлен антибактериальный препарат.

При специальном исследовании уровень экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови 0,615, характерный для группы больных НАБА.

В заключение, обобщим основные положения, изложенные в работе.

Нами исследованы особенности экспрессии транскрипционного фактора T-bet на примере мононуклеаров периферической крови с использованием поликлональных антител с помощью иммуноблоттинга.

При оценке экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови в группе больных АБА при нарастании тяжести течения заболевания и вне зависимости от его фазы выявлено снижение уровня экспрессии по сравнению с группой практически здоровых лиц, что может свидетельствовать о сдвиге

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet ПРИ АБА И НАБА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

Вариант БА	Фаза	n	Медиана (мг)	25-75-й Перцентили	Достоверность различий
АБА	Обострение (1)	12	0,14	0,006-0,15	1-2: p > 0,05*
	Ремиссия (2)	12	0,11	0,005-0,09	
НАБА	Обострение (1)	12	0,34	0,04-0,61	1-2: p = 0,05*
	Ремиссия (2)	12	0,03	0,01-0,41	

Примечание. * – уровень значимости, определяющий достоверность различий (непараметрический критерий Вилкоксона).

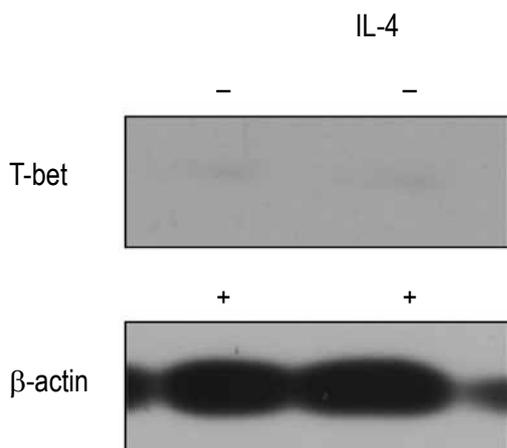


Рисунок 1. Экспрессия транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови исходно и в условиях инкубации с IL-4 – больная К., 25 лет

регуляторного Th1/Th2 баланса в сторону Th2. У больных НАБА существенных различий экспрессии T-bet по сравнению с группой практически здоровых лиц не выявлено.

Данный феномен свидетельствует о комплексном нарушении регуляторного Th1/Th2 баланса у больных АБА в рамках существования биологических дефектов при атопии и заключается в сдвиге баланса в сторону Th2-иммунного ответа за счет нарушения реципрокного контроля со стороны ключевого транскрипционного фактора Th1-клеток T-bet и дефектности механизмов негативной регуляции.

У больных АБА при увеличении тяжести течения заболевания отмечается уменьшение экспрессии транскрипционного фактора T-bet.

Однако важно заметить, что снижение экспрессии транскрипционного фактора T-bet у больных БА обусловлено комплексом причин, среди которых существенное значение может иметь влияние других сигнальных систем и нарушение негативного контроля, что составит предмет наших дальнейших исследований.

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

Список литературы

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Экспрессия STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных аллергической бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 405-411.
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. Влияние IL4 на активность транскрипционного фактора STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой // Меди-

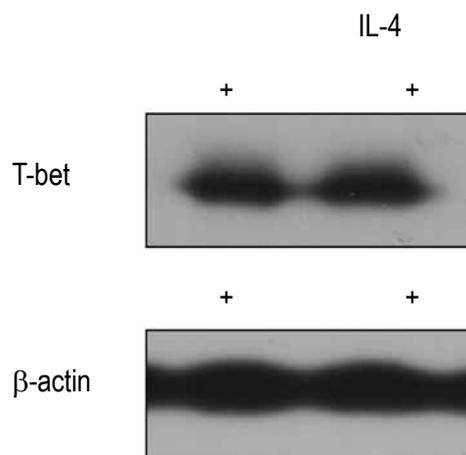


Рисунок 2. Экспрессия транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови исходно и в условиях инкубации с IL-4 – больная М., 47 лет

цинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 177-184.

3. Минеев В.Н., Сорокина, Л.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия транскрипционного фактора GATA-3 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 1-2. – С. 21-28.

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

5. Buono C., Binder C.J., Stavrakis G., Witztum J.L., Glimcher L.H., Lichtman A.H. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102 (5). – P. 1596-1601.

6. Finotto S., Neurath M.F., Glickman J.N., Qin S., Lehr H.A., Green F.H., Ackerman K., Haley K., Galle P.R., Szabo S.J., Drazen J.M., De Sanctis G.T., Glimcher L.H. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet // Science. – 2002. – Vol. 295. – P.336-338.

7. Ko F.W.S., Lun S.W.M., Wong C.K., Szeto C.C., Lam C.W.K., Leung T.F., Hui D.S.C. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma // J. Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 147. – P. 526-532.

8. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment // Cell. – 2000. – Vol. 100. – P. 655-669.

поступила в редакцию 25.04.2011

отправлена на доработку 18.05.2011

принята к печати 30.05.2011