

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PAX-5 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Иванов В.А.,
Липкин Г.И.

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

Резюме. Рассмотрены характеристики экспрессии транскрипционного фактора PAX-5 (paired box 5) (BSAP), при разных клинико-патогенетических вариантах бронхиальной астмы (БА). Низкие уровни экспрессии PAX-5 могут быть причиной утяжеления течения АБА, а высокие — одним из значимых факторов в развитии НАБА. Предполагается, что инициация синтеза иммуноглобулина Е является менее важной функцией PAX-5 в патогенезе БА, чем угнетение дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки. Дальнейшее исследование особенностей PAX-5 и его взаимодействий с другими транскрипционными факторами при БА может представлять одно из перспективных направлений в изучении механизмов развития этого заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, аллергия, транскрипционные факторы, PAX-5, IgE, В-лимфоциты.

Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Lipkin G.I., Ivanov V.A.

ROLE OF PAX-5 TRANSCRIPTION FACTOR IN PATHOGENESIS OF BRONCHIAL ASTHMA

Abstract. Expression characteristics of transcription factor PAX-5 (paired box 5) are considered for different clinical variants of bronchial asthma (BA). Low levels of PAX-5 expression may be a reason for progression into a severe allergic asthma, whereas higher levels of PAX-5 expression may represent a significant factor leading to development of non-allergic bronchial asthma. Initiation of IgE production is supposed to be a less important PAX-5 function in BA pathogenesis, than prevention of B-cell-to-plasmacyte differentiation. Further investigations of PAX-5 properties and its co-operations with other transcription factors may provide a promising path in further research of BA pathogenesis. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 347-352)

Keywords: bronchial asthma, allergy, transcription factors, PAX-5, IgE, B lymphocytes.

Введение

В последнее время все больше исследователей обращают внимание на внутриклеточные системы лимфоцитов как ключевые точки различных патологических процессов: опухолей, аллергического воспаления, иммунодефицитов. Ранее нами уже рассматривалась сигнальная система JAK-STAT в лимфоцитах (Janus-kinase — signal transducer and activator of transcription) и ее роль в развитии и течении бронхиальной астмы [2, 3, 4, 5]. Основным элементом этой системы явля-

ются транскрипционные факторы STAT (signal transducer and activator of transcription), транслирующиеся в ходе своей активации в ответ на воздействие на клетку интерлейкинов 4 и 13 (IL-4 и IL-13) из цитоплазмы в ядро. Транскрипционный фактор STAT6 в В-лимфоцитах участвует в процессах синтеза иммуноглобулина Е и рецептора к нему FcεR II (CD23) [8, 11]. В В-клеточных процессах принимают участие и другие транскрипционные факторы, формирующие целые каскады взаимодействий, в том числе — белок PAX-5 (paired box 5), именуемый также BSAP (B-cell specific activator protein). Этот транскрипционный фактор является ключевым фактором развития В-клеток во время лимфопоэза [6] и наряду со STAT6 участвует в переключении В-лимфоцитов на синтез IgE [8]. По данным литературы, этот белок привлекает внимание

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
198516, Санкт-Петербург, Петродворец,
Санкт-Петербургский пр., 56, кв. 15
Тел.: (812) 450-71-63.
E-mail: minvn@spmu.rssi.ru

преимущественно как один из компонентов патогенеза опухолевых процессов [9, 10].

Роль В-лимфоцитов в развитии бронхиальной астмы позволяет предполагать, что PAX-5 может быть весьма значимым фактором в патогенезе заболевания [6], поэтому **целью нашей работы** было оценить роль PAX-5 в механизмах развития бронхиальной астмы (БА), выявить связи содержания PAX-5 в лимфоцитах больных БА с клиническими и лабораторными характеристиками заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 18 практически здоровых лиц, 68 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 39 – неаллергической БА (НАБА) разной степени тяжести.

Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии СПбГМУ имени академика И.П. Павлова. Проводилось комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое обследование. В обследованных группах проводили исследование функции внешнего дыхания. Диагноз устанавливали и проводили лечение в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2010). Для исследования использовали лимфоциты периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности Lymphoseparation Medium (производство “MP Biomedicals”, США) с использованием стандартной методики выделения моноклеаров (Boyum, 1968) с последующим удалением моноцитов с осаждением на пластике в условиях инкубации в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 1 часа.

Экспрессию мРНК PAX-5, β-актина и тяжелых цепей иммуноглобулина Е (СН_ε) оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription-PCR – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция [ПЦР]) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из лимфоцитов периферической крови. ПЦР проводилась в амплификаторе «iCycler» (BIO-RAD) в следующем режиме: инициация при 95 °C в течение 4-х минут, 30 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, «отжига» праймеров при 60 °C в течение 30 с и полимеризации при 70 °C в течение 30 с. Завершающая полимеризация проводилась при 72 °C в течение 7 минут. Продукты амплификации размерами 241 пара оснований (PAX-5), 476 п.о. (СН_ε) и 315 п.о. (β-актин) подвергались электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировался в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК PAX-5 оценивался относительно уровня β-актина.

Праймеры для PAX-5, β-актина, СН_ε были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank) (PAX-5 5': 5'- GGA ACT TGG AGA GGG AGC TT-3' и PAX-5 3': 5'- GGC TCT ACC TGG CTG TTC TG-3'; β-актин 5': 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3' и β-актин 3': 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'; СН_ε 5': 5'-GGG TAC ACC CCA GGG ACT AT -3' и СН_ε 3': 5'-TCT GGT GGA GTG GTT CAC AG-3').

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы SPSS 13.0 с использованием методов и критериев параметрической и непараметрической статистики.

Результаты

Уровни экспрессии мРНК PAX-5 в лимфоцитах периферической крови у больных НАБА существенно выше, чем в группах АБА (p = 0,03) и практически здоровых лиц (p = 0,018) (кри-

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ мРНК PAX-5 У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И У БОЛЬНЫХ БА (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β-АКТИНУ)

Контрольная группа (n = 18)			Больные АБА (n = 58)			Больные НАБА (n = 34)		
Медиана	Процентили		Медиана	Процентили		Медиана	Процентили	
	25-й	75-й		25-й	75-й		25-й	75-й
0,49	0,42	0,66	0,51	0,41	0,64	0,64	0,53	0,76

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНОГО ОБЩЕГО IgE И мРНК СНε (КОЭФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМАНА)

Группы обследованных	IgE	мРНК СНε
Практически здоровые лица	$r = 0,343$; $p = 0,211$; $n = 15$	$r = 0,564$; $p = 0,028$; $n = 15$
АБА	$r = 0,002$; $p = 0,988$; $n = 52$	$r = 0,528$; $p < 0,001$; $n = 53$
НАБА	$r = -0,006$; $p = 0,976$; $n = 28$	$r = 0,499$; $p = 0,004$; $n = 32$

терий Вилкоксона—Манна—Уитни); значимых различий между группами здоровых лиц и АБА не выявлено (табл. 1).

При проведении анализа по критерию Краскала—Уоллеса разница в экспрессии мРНК PAX-5 между группами больных БА и здоровыми лицами была значимой ($H = 8,21$; $p = 0,017$).

С учетом значимости IgE в патогенезе БА проведена оценка экспрессии IgE и мРНК тяжелых цепей IgE и ее связи с экспрессией мРНК PAX-5 (табл. 2).

Роль PAX-5 в синтезе константных частей тяжелых цепей IgE у больных АБА, вероятно, является несколько более значимой по сравнению с группой НАБА, а вклад PAX-5 в продукцию собственно IgE уменьшается в группах больных БА по сравнению с контрольной группой.

Кроме того, при корреляционном анализе сила и значимость связи экспрессии PAX-5 с экспрессией СНε были несколько выше в группе больных БА с нормальным и низким содержанием IgE в сыворотке (менее 150 МЕ/мл), чем в группе с высоким содержанием IgE (более

150 МЕ/мл) ($r = 0,543$; $p < 0,001$; $n = 53$ против $r = 0,474$; $p = 0,017$; $n = 25$). Можно предположить, что нарастание концентрации IgE обусловлено снижением контроля продукции его тяжелых цепей со стороны PAX-5 и повышением активности других транскрипционных факторов, контролирующих синтез СНε (например, STAT6).

Основным исследованием, объективно характеризующим течение БА, является исследование функции внешнего дыхания, поэтому большой интерес представляют связи спирометрических показателей с экспрессией транскрипционных факторов, представленные в таблице 3.

По-видимому, снижение уровней экспрессии мРНК PAX-5 при АБА может быть связано с усилением бронхообструктивных процессов и ростом сопротивления бронхов воздушному потоку.

Еще одной чертой АБА является эозинофилия крови и мокроты. Рассмотрим, насколько связаны уровни экспрессии мРНК с показателями цитологического исследования содержимого бронхов. Нами обнаружена значимая отрицательная корреляция уровня экспрессии мРНК PAX-5

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФВД (КОЭФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМАНА)

Показатели ФВД	АБА	НАБА
Индекс Тиффно до бронхолитика	$p = 0,366$; $p = 0,007$; $n = 53$	$p = 0,040$; $p = 0,833$; $n = 31$
Индекс Тиффно после бронхолитика	$p = 0,366$; $p = 0,007$; $n = 53$	$p = -0,101$; $p = 0,588$; $n = 31$
МОС50выд / МОС50вд до бронхолитика	$p = 0,333$; $p = 0,021$; $n = 48$	$p = 0,031$; $p = 0,866$; $n = 32$
МОС50выд (% от должного) до бронхолитика	$p = 0,279$; $p = 0,041$; $n = 54$	$p = -0,018$; $p = 0,922$; $n = 33$

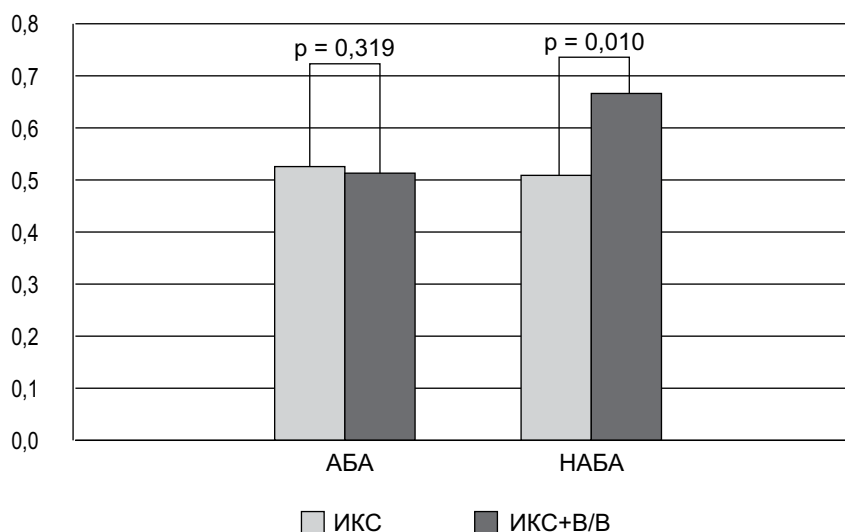


Рисунок 1. Медианы уровней экспрессии мРНК RAX-5 в группах больных аллергической БА (АБА) и неаллергической БА (НАБА), принимавших ингаляционные кортикостероиды (ИКС) и комбинацию ИКС и внутривенных кортикостероидов (ИКС+В/В) (показаны уровни значимости по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни)

с количеством лейкоцитов ($p = -0,390$; $p = 0,040$; $n = 28$) и эозинофилов ($p = -0,385$; $p = 0,043$; $n = 28$) в мокроте больных АБА. При высоком уровне мРНК RAX-5 (значения экспрессии более 0,9 по отношению к уровню экспрессии мРНК β -актина) подобная связь наблюдалась и с количеством эозинофилов в периферической крови ($p = -0,881$; $p = 0,004$; $n = 8$). Эти данные соотносятся с результатами анализа показателей ФВД и свидетельствуют о возможном блокировании фактором RAX-5 процессов аллергического воспаления.

Как известно, основными препаратами для базисной терапии БА являются глюкокортикостероиды (ГКС). В группе больных, принимавших пероральные ГКС ($n = 5$), уровень экспрессии мРНК RAX-5 был значительно выше, чем в группе БА, не принимавших пероральные ГКС ($0,97 \pm 0,44$ против $0,62 \pm 0,25$ по отношению к экспрессии мРНК β -актина, критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p = 0,049$). Значимые различия наблюдались при анализе групп больных НАБА, принимавших только ингаляционные ГКС, и тех, кто дополнительно к этому получал ГКС внутривенно. В группе АБА различия были менее значимыми (рис. 1). Кроме этого, была выявлена значимая положительная корреляция между уровнем экспрессии мРНК RAX-5 и суточной дозой ингаляционных ГКС у больных БА ($r = 0,254$; $p = 0,034$; $n = 70$).

Обсуждение

По данным литературы, транскрипционный фактор RAX-5 обладает различными функциями. Он не только переключает В-лимфоциты на продукцию IgE, но и обеспечивает приверженность В-клеток своей линии дифференцировки, препятствуя их апоптозу и превращению в плазматические клетки за счет угнетения плазмоцит-специфических генов [8].

Несмотря на то, что RAX-5 способствует синтезу IgE, у больных БА с высокими уровнями экспрессии RAX-5 в лимфоцитах, тем не менее, наблюдаются меньшая выраженность обструкции по показателям ФВД и низкая степень воспалительных изменений мокроты и ее эозинофилии. В то же время RAX-5 значительно больше экспрессирован при НАБА. Можно предположить, что нарастание экспрессии RAX-5 ведет к продлению жизненного цикла В-лимфоцитов и их активности, выражающейся, в том числе, в усиленной презентации растворимых антигенов Т-хелперам. Малое количество RAX-5, вероятно, недостаточно для блокирования дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки, которые лишаются поверхностных рецепторных комплексов и молекул главного комплекса гистосовместимости II, утрачивая, таким образом, возможность быть антиген-презентирующей клеткой [7]. Снижение концентрации RAX-5 способствует, по всей видимости, преимущественному развитию Th2-пути иммунного

ответа и аллергического варианта БА. Это может быть подтверждено снижением концентрации PAX-5 при утяжелении течения АБА. Кроме того, инициирующее переключение В-лимфоцитов на синтез IgE фактором PAX-5, по-видимому, слабо отражается на концентрации свободной фракции этого иммуноглобулина в сыворотке. Основными продуцентами IgE являются именно плазмоциты, в которых PAX-5 уже супрессирован. По всей видимости, на этой стадии дифференцировки В-клеток основной вклад в синтез IgE вносят уже другие факторы (например, STAT6), что косвенно подтверждается фактом снижения корреляции экспрессии PAX-5 и СНг у пациентов с высокими уровнями сывороточного IgE. В связи с этим, нельзя исключить, что два этих белка (PAX-5 и STAT6) обладают взаимным ингибирующим влиянием друг на друга. Ранее нами было выявлено утяжеление проявлений БА у больных с высокими уровнями экспрессии STAT6 [5].

Связь приема ГКС с уровнем экспрессии PAX-5, вероятно, отражает возможную зависимость синтеза этого белка от транскрипционной активности стероидов. В то же время увеличение экспрессии PAX-5 и соответствующее угнетение превращения В-лимфоцитов в секреторно-активные плазматические клетки могут лежать в основе противовоспалительного (противоаллергического) действия ГКС.

В заключении можно отметить, что PAX-5 в патогенезе БА в большей степени действует как фактор угнетения дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки, чем как активатор синтеза IgE. Низкие уровни экспрессии PAX-5, по-видимому, могут быть причиной утяжеления течения АБА, а высокие — одним из значимых факторов в развитии НАБА. Можно также предположить, что в В-лимфоцитах существует баланс транскрипционных факторов, регулирующих их секреторную и антиген-представляющую активность. Нарушение этого баланса может лежать в основе развития БА.

Сложность взаимодействия различных факторов в функционировании В-лимфоцитов требует более пристального внимания как к В-клеткам в целом, так и к сигнальным системам этих клеток. Безусловно, детальной оценки требуют и взаимоотношения транскрипционных факторов с рецепторными звеньями сигнальной системы JAK-STAT и системы IgE — CD23.

Тем не менее, внутри различных каскадов транскрипционных факторов можно выделить преимущественно провоспалительные и проти-

вовоспалительные звенья, что послужит предпосылкой к разработке принципиально новых поколений лекарственных веществ, влияющих на патогенез бронхиальной астмы.

Работа была частично поддержана в 2011 году грантом Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов (№ 4/04-05/1-А).

Список литературы

1. Бережная Н.М. Интерлейкин-25 (IL-17E): виновник аллергии и противник рака // Цитокины и воспаление. — 2010. — № 3. — С. 3-14.
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. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. Влияние IL-4 на активность транскрипционного фактора STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11, № 2-3. — С. 177-184.
5. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И. Фундаментальные и клинические аспекты JAK-STAT-сигнализации — СПб.: ВВМ, 2010. — 120 с.
6. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И. Роль транскрипционного фактора PAX-5 в иммунологических процессах // Медицинская иммунология. — 2011. — № 6. — С. 569-580.
7. Фрейдлин И.С., Тотолян Арег А. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 2001. — 389 с.
8. Gould H.J., Beavil R.L., Vercelli D. IgE isotype determination: epsilon germline gene transcription, DNA recombination and B-cell differentiation // Br. Med. Bull. — 2000. — Vol. 56, N 4. — P. 908-924.
9. Mahmoud M.S., Huang N., Nobuyoshi M., Lisukov I.A., Tanaka H., Kawano M.M. Altered expression of Pax-5 gene in human myeloma cells // Blood. — 1996. — Vol. 87, N 10. — P. 4311-4315.

10. Oppezso P., Dumas G., Lalanne A.I., Payelle-Brogard B., Magnac C., Pritsch O., Dighiero G., Vuillier F. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells // Blood. – 2005. – Vol. 105, N 6. – P. 2495-2503.

11. Visan I.A. The CD23 receptor-regulation of expression and signal transduction: Dissertation zur Erlangung des natur wissenschaftlichen

Doktorgrades / Bayerische Julius-Maximilian Universität Würzburg vorgelegt von. – Würzburg, 2003. – 116 p. www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2003/555/pdf/The_CD23_receptor_regulation_of_expression_and_signal_trans.pdf

поступила в редакцию 14.12.2011

отправлена на доработку 06.01.2012

принята к печати 19.01.2012