ЭКСПРЕССИЯ мРНК ФЕРМЕНТА AID В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н.

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Цель исследования — оценка возможной роли энзима AID (AICDA — activation-induced (cytidine) deaminase) в патогенезе бронхиальной астмы (БА).

Материалы и методы. Обследовали 12 практически здоровых лиц и 42 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 27 — неаллергической БА (НАБА).

Экспрессию мРНК AID оценивали путем проведения RT-PCR.

Результаты. мРНК AID значимо больше экспрессирована при БА, чем у здоровых лиц, в то же время не наблюдается значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания.

Корреляционный анализ уровней экспрессии мРНК AID, мРНК СН ϵ и уровня общего сывороточного IgE выявил значимую обратную связь только при неаллергическом варианте заболевания.

Уровни экспрессии мРНК AID в лимфоцитах периферической крови имеют прямую и значимую связь с клиническими показателями у больных БА, которые характеризуют тяжесть, фазу заболевания. Кроме этого, выявлены прямые корреляционные связи с содержанием эозинофилов в мокроте.

Выводы. Делается вывод о том, что нормальная регуляция переключения синтеза антител по принципу отрицательной обратной связи, характерная для здоровых лиц, нарушается при аллергической БА, но сохраняется при неаллергическом варианте заболевания.

Ключевые слова: мРНК AID, AICDA, бронхиальная астма, лимфоциты

EXPRESSION OF AID-SPECIFIC mRNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA

Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to evaluate a possible role of AID (AICDA — activation-induced (cytidine) deaminase) in the bronchial asthma (BA) pathogenesis. Materials and methods. We have examined twelve healthy control persons, forty-two patients with allergic bronchial asthma (ABA) and twenty-seven patients with non-allergic bronchial asthma (NABA). The AID mRNA expression was evaluated by means of RT-PCR. Results: AID mRNA was more significantly expressed in BA, than in healthy controls. Meanwhile,

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени акад. И.П. Павлова
198516, Россия, Санкт-Петербург, Петропавловская
Санкт-Петербургский пр., 56, кв. 15.
Тел.: 8 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Address for correspondence:

Mineev Valeriy N.
St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
198156, Russian Federation, St. Petersburg, Petrodvorets,
St. Petersburg pr., 56, apt 15.
Phone: 7 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Образец цитирования:

В.Н. Минеев, М.А. Нёма, Л.Н. Сорокина, «Экспрессия мРНК фермента AID в лимфоцитах периферической крови при бронхиальной астме» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 71–74.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-71-74
© Минеев В.Н. и соавт., 2015

For citation:

V.N. Mineev, M.A. Nyoma, L.N. Sorokina, “Expression of AID-specific mRNA in peripheral blood lymphocytes in bronchial asthma”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 71–74.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-71-74
DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-71-74>

no significant differences were revealed between ABA and NABA groups. Correlation analysis of AID mRNA expression levels in peripheral blood lymphocytes has shown that CH ϵ mRNA and total serum IgE revealed significant negative correlation, in the NABA group only. The levels of AID mRNA expression in peripheral blood lymphocytes exhibited positive and significant correlations with clinical characteristics, reflecting severity and stage of the disease, in BA patients. Moreover, a significant positive correlation was revealed with eosinophil contents in sputum. Conclusion. It was concluded that normal regulation of IgE class switching normally based on feedback regulation, was impaired in ABA but not affected in NABA.

Keywords: mRNA, activation-induced (cytidine) deaminase, bronchial asthma, lymphocytes

Работа поддержана грантом СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова для научных инновационных проектов (2012 г.).

Введение

Одним из ключевых элементов патогенеза бронхиальной астмы является иммуноглобулин Е (IgE). Продукция больших количеств антител этого класса обусловлена переключением В-лимфоцитов на их синтез (class switch recombination – CSR). Этот процесс инициируется ферментом AID (AICDA – activation-induced [cytidine] deaminase) – индуцируемой активацией цитидиновой деаминазой.

AID деаминирует цитозин ДНК в генах, кодирующих цепи иммуноглобулинов, превращая его в урацил, что приводит к инициации процесса переключения В-лимфоцитов с продукции IgM на синтез других классов антител, в частности – IgE. Считается, что кроме CSR, этот фермент участвует и в процессе реаранжировки генов вариабельных частей иммуноглобулинов – соматической гипермутации (somatic hypermutation – SHM) [4].

Исследования, касающиеся оценки экспрессии AID при БА, практически отсутствуют. Исключение составляет работа Р. Takhar et al. [5], которые показали экспрессию этого энзима в слизистой оболочке бронхов при atopическом и неатопическом вариантах БА, а также исследования [3, 6], где экспрессия AID была показана в слизистой оболочке носа при аллергическом рините.

Ранее мы уже анализировали факторы, контролирующие образование IgE: PAX-5 и STAT6 [1, 2]. Транскрипционный фактор PAX-5 регулирует не только экспрессию тяжелых цепей IgE, но и активирует транскрипцию AID. С учетом ключевой значимости AID в процессе образования IgE **целью нашей работы** стала оценка возможной роли AID в патогенезе бронхиальной астмы (БА).

Материалы и методы

Обследовано 12 практически здоровых лиц, 42 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 27 – неаллергической БА (НАБА).

Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии имени ака-

демика М.В. Черноруцкого ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова. Проводили комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое исследование. Диагноз устанавливали и проводили лечение в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2012). Для исследования использовали лимфоциты периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности Lymphoseparation Medium («ICN») с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров с последующим удалением моноцитов с осаждением на пластике в условиях инкубации в среде IMDM при 37 °C в течение 40 мин.

RT-PCR. Экспрессию мРНК AID оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription-PCR – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ПЦР)) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из лимфоцитов периферической крови. ПЦР проводили в амплификаторе «iCycler» (BIORAD) в следующем режиме: инициация при 95 °C в течение 4-х минут, 30 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, отжига при 60 °C в течение 30 с и полимеризации при 70 °C в течение 30 с. Завершающую полимеризацию проводили при 72 °C в течение 7 минут. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК AID и тяжелых цепей IgE (эпсилон-цепей) оценивали относительно уровня β -актина.

Праймеры для AID, тяжелых цепей IgE (CH ϵ) и β -актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank). (AID 5': 5'-gat tgt gac ccc aaa cca tc -3' и AID 3': 5'-ccc caa cat tca agc aac tt -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 непараметрической статистики при малом значении числа наблюдений: критериев Вилкоксона, Манна-Уитни, коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим, как распределена экспрессия мРНК AID в группах больных БА и практически здоровых лиц (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, мРНК AID значимо больше экспрессирована при БА, чем у здоровых лиц, в то же время не наблюдается значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания.

Уровни экспрессии мРНК AID значимо коррелируют с относительным содержанием эозинофилов в мокроте (r Спирмена = 0,319; n = 44; p = 0,035), количеством нейтрофилов периферической крови (r Спирмена = 0,242; n = 69; p = 0,035) у больных БА.

Рассмотрим теперь, как коррелируют уровни экспрессии мРНК AID и тяжелых цепей имму-

ноглобулина Е с уровнем общего сывороточного IgE (табл. 2).

Положительная связь между уровнями экспрессии мРНК AID и уровнем мРНК тяжелых цепей IgE в контрольной группе сменяется значимой отрицательной корреляцией среди больных НАБА, а в группе больных АБА теряет значимость и также имеет отрицательную направленность. Это, по-видимому, указывает на то, что нормальная регуляция переключения синтеза антител, характерная для здоровых лиц, при БА нарушается: высокие уровни мРНК СН ϵ за счет механизмов обратной связи, вероятно, угнетают транскрипцию мРНК AID. Данное предположение можно подтвердить тем, что у больных аллергической БА с высокими концентрациями общего IgE в сыворотке (более 200 МЕ/мл) уровни экспрессии мРНК AID значимо меньше, чем у лиц с уровнями IgE менее 200 МЕ/мл (t = -0,293; p = 0,047).

Для оценки вклада AID в реализацию потенциала В-клеток к синтезу IgE мы проанализировали индекс отношения уровней общего сывороточного IgE к экспрессии мРНК его тяжелых цепей в связи с экспрессией AID: в группе больных БА коэффициент корреляции Пирсона r составил -0,285 (p = 0,017; n = 70), у здоровых лиц значимой связи не наблюдалось.

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК AID В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ ($M \pm \sigma$) (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

Группа обследования	Значение	Значимость различий ¹
Контрольная группа (практически здоровые лица) n = 12 (1)	0,77 $\pm$ 0,29	1-2: p = 0.013 ¹ 2-3: p > 0.05 1-3: p = 0.036
Больные АБА n = 42 (2)	1,07 $\pm$ 0,52	
Больные НАБА n = 27 (3)	1,09 $\pm$ 0,48	

Примечание. ¹ – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован t -критерий).

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК AID С УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНОГО ОБЩЕГО IgE И мРНК СН ϵ (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К мРНК β -АКТИНА) (КОЭФФИЦИЕНТ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА ρ)

Обследованные лица	IgE	мРНК СН ϵ
Практически здоровые лица	ρ = 0,482; p = 0,133; n = 11	ρ = 0,473; p = 0,142; n = 11
АБА	ρ = -0,214; p = 0,192; n = 39	ρ = -0,095; p = 0,572; n = 38
НАБА	ρ = 0,275; p = 0,183; n = 25	ρ = -0,423*; p = 0,035; n = 25

Примечание. Статистически значимые корреляции отмечены знаком *.

Кроме этого, выявлена прямая корреляционная связь с содержанием эозинофилов в мокроте (τ Кендала = 0,233; $p < 0,05$; $n = 44$). Также обнаружено, что уровни экспрессии мРНК AID повышены у больных БА, проходящих лечение системными глюкокортикоидами ($t = 2,353$; $p < 0,05$).

Как отмечено выше, нами не выявлено значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания, что совпадает с результатами исследования других авторов [6], однако полностью согласиться с их мнением о патофизиологической идентичности этих вариантов заболевания нельзя.

Так, у больных БА имеет место повышение экспрессии мРНК AID в лимфоцитах периферической крови, что, по-видимому, способствует

продукции IgE и прогрессированию воспалительного процесса в бронхах. В то же время при неаллергическом варианте заболевания экспрессия мРНК AID, возможно, регулируется по принципу отрицательной обратной связи.

В заключение можно отметить, что, вероятно, анализ уровней экспрессии белка AID, полиморфизмов его гена позволит получить дополнительные сведения о роли этого фермента в патогенезе БА и взаимоотношений его экспрессии с уровнями его мРНК при различных вариантах заболевания. Важность этих исследований подчеркивается перспективой разработки таргетной терапии, включая топическую, направленную на механизм переключения В-клеток на синтез IgE (CSR) [6].

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Еремеева А.В. Взаимодействие транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 35-42. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Eremeeva A.V. Interaction of transcription factors PAX-5 and STAT6 in pathogenesis of allergic bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 35-42. (In Russ.)]
2. Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И., Минеев В.Н. Роль транскрипционного фактора PAX-5 в иммунологических процессах // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 6. С. 569-580. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Ivanov V.A., Lipkin G.I. Role of PAX-5 transcription factor in immunological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011. Vol. 13, no 6, pp. 569-580. (In Russ.)]
3. Coker H.A., Durham S.R., Gould H.J. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 5602-5610.
4. Laffleur B., Denis-Lagache N., Péron S., Sirac C., Moreau J., Cogné M. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget*, 2014, no. 5, pp. 1118-1131.
5. Takhar P., Corrigan C.J., Smurthwaite L., O'Connor B.J., Durham S.R., Lee T.H., Gould H.J. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 119, pp. 213-218.
6. Takhar P., Smurthwaite L., Coker H.A., Fear D.J., Banfield G.K., Carr V.A., Durham S.R., Gould H.J. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J. Immunol.*, 2005. Vol. 174, pp. 5024-5032.

Авторы:

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., ассистент, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 04.11.2014

Отправлена на доработку 10.11.2014

Принята к печати 24.11.2014

Received 04.11.2014

Revision received 10.11.2014

Accepted 24.11.2014