

## Н. Н. Каладзе, С. В. Тришина, З. З. Аметшаева ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА И ИХ ДИНАМИКА В ПРОЦЕССЕ САНАТОРНОГО ЛЕЧЕНИЯ У ДЕТЕЙ, БОЛЕЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

*Крымский медицинский университет им. С. И. Георгиевского*

В последние годы активно изучается роль апоптотического механизма иммуносупрессии в патогенезе аллергических заболеваний, в том числе бронхиальной астмы (БА). Повышенный интерес обусловлен концептуальной версией, согласно которой в основе иммунодефицитных и аутоиммунных заболеваний лежит чрезмерная активация иммунокомпетентных клеток. Принципиальным различием является то, что при иммунодефицитах их активация заканчивается гибелью (негативная активация, апоптоз), тогда как при аутоиммунных заболеваниях активация приводит к накоплению аутореактивных клонов (позитивная активация, отсутствие апоптоза) [9, 11, 13, 16]. Исследование маркеров апоптоза у больных БА показало, что этот биологический процесс изменен как при обострении, так и в фазе ремиссии заболевания. В частности, при обострении БА увеличивается количество CD95-позитивных клеток. Уменьшение их числа происходит в процессе терапии глюкокортикоидами [6]. Авторами также выявлено, что в фазе обострения БА наблюдается снижение апоптотического индекса ядер эффекторных клеток индуцированной мокроты и его повышения на фоне противовоспалительной терапии. Сниженная индукция апоптоза у больных БА повышается под влиянием ИЛ-4 [8]. Отмечено, что клетки (лимфоциты, эозинофилы, нейтрофилы) больных атопической формой БА устойчивы к процессам спонтанного апоптоза, и именно воздействием на данный процесс может быть объяснена терапевтическая эффективность глюкокортикоидов [3]. Для фазы ремиссии БА тоже характерна повышенная активация лимфоцитов, проявляющаяся в увеличении числа клеток, несущих активационные антигены CD23; CD25; CD7; HLA-DR; CD95; CD54; CD30 [7].

В доступной литературе нам не удалось найти сведений, касающихся особенностей апоптоза у детей, больных БА, на санаторном этапе реабилитации. В связи с этим и была поставлена цель: изучить отдельные маркеры апоптоза у данного контингента больных в процессе санаторного лечения.

Обследовано 39 детей, болеющих БА, в возрасте 8–14 лет (16 девочек и 23 мальчика). У 21 ребенка была диагностирована интермиттирующая форма заболевания, у 18 — персистирующая, средней степени тяжести, фаза ремиссии. Длительность болезни варьировала от 2 до 6 лет. Дети находились в санатории и получали стереотипный комплекс реабилитационного лечения (массаж, аэрозоли, физиопроцедуры и т.д.). Исследование проводилось дважды: при поступлении и при выписке. Объектом исследования служила венозная гепаринизированная кровь, которую наслаивали на градиент плотности фикколверографин для последующего центрифугирования и получения мононуклеаров в искомой концентрации 2 мгг клеток в 1 мл. Активность ИЛ-2 изучали методом De Vos С., Libert W. [14]. Его уровень выражали в относительных величинах — ед./мл, что соответствует количеству ИЛ-2,

достаточного для индукции 50 % пролиферации от максимального пролиферативного ответа клеток. Этот показатель в группе здоровых детей составил  $178,1 \pm 8,5$  ед./мл. Количественное определение ИЛ-4 в сыворотке крови проводили фотометрически при помощи набора реагентов Pro Con IL-4 (Россия). Величина этого показателя у детей контрольной группы колебалась в диапазоне 30–50 пкг/мл, составив в среднем  $42,3 \pm 1,8$  пкг/мл. Рецептор СВ95 (как один из маркеров апоптоза) определялся в реакции с моноклональными антителами методом ИФА из стандартизированных тест-наборов производства НПК "Препарат", Нижний Новгород, Россия. Достоверность полученных результатов определяли методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Полученные данные свидетельствуют, что активность ИЛ-2 снижена независимо от формы БА. Так, при интермиттирующей форме заболевания этот показатель составил  $158,4 \pm 7,5$  ед./мл ( $p < 0,05$ ), при персистирующей —  $148,3 \pm 7,2$  ед./мл, что также на  $34,8$  ед./мл ниже нормы ( $p < 0,01$ ). При сопоставлении же этих показателей между собой различий, достигающих степени достоверности, выявить не удалось ( $p > 0,5$ ). Наблюдаемое у детей, страдающих БА, снижение продукции ИЛ-2 квалифицировалось как одно из проявлений дисбаланса иммунной системы [15], который сохраняется в фазе ремиссии. Ингибция продукции этого медиатора может быть связана с накоплением иммуносупрессивных факторов, к которым относятся иммунные комплексы, простагландины [2]. Биологическая эффективность ИЛ-2 зависит от экспрессии рецепторов на мембране Т-клеток, представляющих собой две гликопротеидные цепи ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Поэтому различные взаимодействия с участием этого лимфокина могут быть обусловлены не только снижением его продукции, но и изменениями со стороны соответствующих рецепторов (ИЛ-2R) и генов, кодирующих этот рецептор. Одним из доказательств сложности интерпретации сведений о продукции ИЛ-2 служит дискретность пролиферативной реакции в ответ на этот цитокин. Тем не менее, рассматривая низкие уровни ИЛ-2 в фазе ремиссии БА в контексте репаративного процесса, можно найти логическое объяснение сложившейся ситуации. Последнее, на наш взгляд, заключается в том, что активация регенерации сопровождается снижением количества и функциональной активности Т-лимфоцитов [1]. Кроме того, о вовлечении системы ИЛ-2-ИЛ-2R в формирование персистирующего аллергического процесса у детей, болеющих БА, свидетельствует увеличение числа CD25+ клеток, продуцирующих этот цитокин, в слизистой бронхов. Наиболее отчетливо это проявляется в фазе обострения. Ремиссия заболевания характеризуется низкими цифрами регионарной активности ИЛ-2, в частности, его содержания в конденсате выдыхаемого воздуха [10], что, по нашему мнению, может являться следствием системного снижения уровня изучаемого лимфокина.

Подобная аргументация уместна, по нашему мнению, и для объяснения вероятных причин снижения уровня ИЛ-4 в крови и бронхиальном секрете у больных в фазе

ремиссии БА [12]. Логический алгоритм формируется исходя из того, что основными продуцентами ИЛ-4 являются CD4+ и CD8+ лимфоциты, В-лимфоциты и макрофаги, а главная функциональная нагрузка заключается в регулировании процессов дифференцировки лимфоцитов Th0 в лимфоциты Th-1 и Th-2, синтеза IgE и продукции провоспалительных цитокинов. По нашим данным, уровень ИЛ-4 в сыворотке крови у детей, страдающих БА, в фазе ремиссии зависит от формы болезни. Так, при интермиттирующем варианте клинического течения этот показатель составляет  $52,6 \pm 3,0$  пкг/мл, что на  $10,3$  пкг/мл больше, нежели у здоровых лиц, но это различие не достигает степени достоверности ( $p > 0,1$ ). У детей с персистирующим течением БА содержание этого лимфокина остается высоким, относительно контрольных цифр —  $80,6 \pm 3,8$  пкг/мл ( $p < 0,001$ ). Кроме того, полученный показатель значительно выше, чем у детей, болеющих интермиттирующей формой БА.

Анализ экспрессии на лимфоцитах Fas/CD95 у больных детей свидетельствует, что число CD95-позитивных клеток при интермиттирующей форме БА не выходит за пределы физиологического диапазона. До начала санаторного лечения их удельный вес составил  $27,6 \pm 1,3$  % при норме  $27,25 \pm 1,4$  % ( $p > 0,5$ ). Такой же уровень сохраняется и при выписке —  $25,1 \pm 1,25$  % ( $p > 0,5$ ). При персистирующей БА при поступлении у детей отмечается  $34,6 \pm 1,3$  % CD95-позитивных клеток. Указанный показатель не отличается от нормального ( $p < 0,1$ ). Под влиянием лечения происходит его достоверное уменьшение на  $11,7$  % ( $p < 0,05$ ), но полученная величина ( $22,9 \pm 1,2$  %) остается в рамках нормальных колебаний ( $p < 0,1$ ).

Интерпретация полученных данных представляется адекватной только с учетом сложного процесса индуцирования апоптоза, выживания и кондиций Т-клеток. Известно, что ИЛ-2 в отношении активированных Т-лимфоцитов может выступать в качестве как антиапоптотического, так и проапоптотического цитокина. Проапоптотическое действие ИЛ-2 заключается в том, что он способен стимулировать входение Т-лимфоцитов в пролиферацию, повышать их чувствительность к апоптозу за счет усиления образования DISC-комплекса и подавления образования ингибитора апоптоза С-FLIP. Под влиянием ИЛ-2 возрастает индукция клеточных рецепторов и образование FasL и ФНО $\alpha$ . Антиапоптотическое действие ИЛ-2 объясняется вовлечением в процесс апоптоза гуанин-нуклеотид-связывающих белков семейства Rho с последующей активацией киназы РВК/Akt, подавляющей каспазный каскад путем блокирования взаимодействия каспаз с АРАF-1 и активацией ингибиторов апоптоза. Для объяснения вышеуказанных эффектов ИЛ-2 предложена теория обратной связи в контроле апоптоза Т-лимфоцитов. Из нее следует, что ИЛ-2 вызывает повышение чувствительности Т-лимфоцитов к апоптозу. Дальнейшая судьба клеток определяется уровнем антигенного и костимулирующего воздействия. При отсутствии антигенного воздействия (через TCR) уровень ИЛ-2 и его клеточного рецептора падает, и Т-клетки подвергаются "пассивному апоптозу", связанному с дефицитом вышеупомянутого лимфокина. Похожую ситуацию мы наблюдаем в наших исследованиях. Этот путь связан с митохондриями и является нормальным путем ограничения иммунного ответа *in vivo*. "Пассивный" апоптоз Т-клеток может угнетаться цитокинами, имеющими общую  $\gamma$ С-цепь. Это изучаемые

нами ИЛ-2, ИЛ-4, а также ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21. "Активный" апоптоз, наблюдаемый при избытке антигенного воздействия (как пример — фаза обострения БА), является механизмом, ограничивающим гиперактивацию антиген-специфического клона эффекторных клеток. Апоптоз в большинстве случаев осуществляется благодаря взаимодействию рецепторов Fas/CD95 с его лигандами FasL, которые экспрессируются лимфоцитами в процессе их стимуляции антигеном. Вместе с тем, экспрессия Fas в периферических лимфоцитах возрастает благодаря влиянию интерферона- $\gamma$  и ИЛ-2. Характер указанных взаимоотношений в определенной степени объясняет выявленное сочетание низкой продукции ИЛ-2 и невысоких показателей концентрации CD95-позитивных лимфоцитов у больных детей в фазе ремиссии БА в условиях санатория. Неоднозначна роль ИЛ-4 и его относительно высокой концентрации у детей, болеющих персистирующей формой БА. Выявленное повышение уровня ИЛ-4 у обследуемых детей при поступлении в санаторий может свидетельствовать о лабильности *suī generis* Т-клеточного звена иммунитета, что позволяет сомневаться в степени устойчивости фазы ремиссии у этого контингента больных. Вместе с тем нельзя игнорировать и тот факт, что ИЛ-4 стимулирует индукцию апоптоза, способствуя, например, увеличению рецепторов-ловушек типа TRL I-рецепторов. При БА индукция апоптоза снижена, особенно в фазе обострения [8]. Но тканевой гомеостаз определяется адекватной регуляцией апоптотических процессов, и нарушения управляющих систем могут приводить к дисбалансу тканевого равновесия. Другими словами, усиление темпов апоптоза может вести к развитию деструкции ткани, а, следовательно, и к нарушению репаративной регенерации.

Одним из механизмов апоптоза рассматривается следующий алгоритм: ИЛ-12, контролирующей синтез ИФН- $\gamma$ , замедляет индукцию Th2 и конвертирует сигнал толерантности для Th1 в иммунологический сигнал. ИЛ-4 Th2 клеток (но не ИЛ-10) снижает экспрессию Р-цепи рецептора ИЛ-12. Тем самым осуществляется один из предварительных этапов индукции апоптоза. Наряду со стимулирующим, ИЛ-4 присущ и эффект торможения спонтанного и активационного апоптоза, в частности, у незрелых Т-лимфоцитов. Наконец необходимо отметить, что завершение клеточной деградации в процессе апоптоза после разрушения клеточной оболочки осуществляется расположенными вблизи фагоцитами. Таким образом, адекватность апоптоза косвенно зависит от состоятельности реакции фагоцитоза. У детей, болеющих БА, активность фагоцитоза снижена даже в фазе ремиссии и коррекция этого процесса, вероятно, будет способствовать нормализации апоптоза.

### Выводы

1. У детей, болеющих БА — интермиттирующей и персистирующей средней степени тяжести в стадии ремиссии, количество лимфоцитов, несущих активационный рецептор CD95, сохраняется в пределах нормы, хотя степень снижения их уровня в процессе санаторного лечения достигает степени достоверности.

2. Высокий уровень ИЛ-4 и низкие показатели активности ИЛ-2 у больных БА детей, рассматриваемые в контексте активности апоптоза, можно расценивать как явление компенсаторное, направленное на сбалансированность этого биологического процесса в условиях болезни.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаева А. Г.* Иммунология восстановительных процессов // Современные проблемы регенерации. — Йошкар-Ола, 1982. — С. 44–51.
2. *Бережная Н. М.* Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте // Аллергология и иммунология. — 2000. — Т. 1, № 1. — С. 45–60.
3. *Бойчук С. В., Мустафин И. Г., Фассахов Р. С.* Изучение апоптоза при атопической бронхиальной астме // Матер. X Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. Санкт-Петербург, 2000. — С. 26.
4. *Владимирская Е. Б.* Механизмы апоптотической смерти клеток // Гематол. и трансфузиол. — 2002. — Т. 47, № 2. — С. 35–40.
5. *Казначеев К. С.* Механизмы развития цитокин-индуцированного апоптоза // Гематол. и трансфузиол. — 1999. — Т. 44, № 1. — С. 40–43.
6. *Невзорова В. А., Коновалова Е. Н., Суровенко Т. Н., Пазич С. А.* Апоптоз и CD95-антигенная детерминанта эффекторных клеток в индуцированной мокроте у больных бронхиальной астмой и хроническим обструктивным бронхитом // Матер. XI Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. — Москва, 2001. — С. 124.
7. *Порядин Г. В., Журавлева Н. Е., Салмаси Ж. М.* Характеристика активационных антигенов лимфоцитов больных бронхиальной астмой в стадии ремиссии // Матер. XI Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. — Москва, 2001. — С. 48.
8. *Порядин Г. В., Салмаси Ж. М., Журавлева Н. Е.* Интерлейкин-4 стимулирует индукцию апоптоза лимфоцитов у больных бронхиальной астмой // Матер. XII Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. — Москва, 2002. — С. 9.
9. *Сепиашвили Р. И., Шубич М. Г., Колесникова Н. В.* Апоптоз в иммунологических процессах // Аллергология и иммунология. — 2000. — № 1. — С. 15–23.
10. *Суровенко Т. Н., Боровская Т. Ф., Рыбалоченко Я. Б.* ИЛ-2 в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) и СД25-клетки бронхов при бронхиальной астме у детей // Матер. XII Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. — Москва, 2002. — С. 22.
11. *Чернушенко Е. Ф.* Актуальные проблемы иммунологии // Український пульмонологічний журнал. — 2003. — № 2. — С. 94–96.
12. *Шири Зиад Али, Трофимов В. И., Шапорова Н. Л.* Особенности цитокинового спектра у больных бронхиальной астмой // Матер. XI Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. — Москва. — 2000. — С. 113.
13. *Chinnaiyan A., Dixit V.* The cell-death machine // Curr.Biol. — 1996. — Vol. 6. — P. 552–562.
14. *De Vos C., Libert W. A.* A simple reppid method for detection of IL-2 in a physiological medium // J. Immunol. Meth. — 1984. — Vol. 74, № 2. — P. 374–384.
15. *Hsieh K. H., Lue K. H.* Defective monokine production and decreased responsiveness of polymorphonuclear leucocytes to recombinant in interleukin-1 in asthmatic patients // J. Clin. Immunol. — 1987. — Vol. 27, № 3. — P. 203–209.
16. *Willie A. H., Kerr I. F. R., Currie A. R.* Cell death: the significance of apoptosis // Int.Cytol. — 1980. — Vol. 68. — P. 25–34.

### ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА И ИХ ДИНАМИКА В ПРОЦЕССЕ САНАТОРНОГО ЛЕЧЕНИЯ У ДЕТЕЙ, БОЛЕЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

*Н. Н. Каладзе, С. В. Тришина,  
З. З. Аметшаева*

#### Резюме

У детей, больных бронхиальной астмой, в процессе санаторного лечения изучен ряд показателей (CD95, ИЛ-2, ИЛ-4), отражающих активность апоптотического процесса. Полученные данные свидетельствуют, что у детей, болеющих БА — интермиттирующей и персистирующей средней степени тяжести в стадии ремиссии, количество лимфоцитов, несущих активационный рецептор CD95, сохраняется в пределах нормы, хотя степень снижения их уровня в процессе санаторного лечения достигает степени достоверности. Высокий уровень ИЛ-4 и низкие показатели активности ИЛ-2 у больных БА детей, рассматриваемые в контексте активности апоптоза, можно расценивать как явление компенсаторное, направленное на сбалансированность этого биологического процесса в условиях болезни.

### THE DYNAMICS OF APOPTOSIS PARAMETERS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA DURING THE COURSE OF SANATORIUM TREATMENT

*N. N. Kaladze, S. V. Trishina,  
Z. Z. Ametshaeva*

#### Summary

Several parameters (CD95, IL-2, IL-4), reflecting activity of apoptotic process, were studied in children with bronchial asthma (BA) during the course of sanatorium treatment. The received data suggest, that in children with intermittent and persisting moderate BA in a stage of remission the quantity of CD95 lymphocytes remained within normal limits, though the degree of reduction of their level in dynamics of sanatorium treatment achieved the level of significance. High level of IL-4 and low parameters of activity of IL-2 in children with BA, considered in a context of apoptosis activity, could be a compensation phenomenon, directed on equation of this biological process in the disease conditions.