

І. П. Кайдашев, Н. Л. Куценко
ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ CD4+CD25+ Т-КЛІТИН У ХВОРИХ
АТОПІЧНОЮ БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

В результаті досліджень в галузі імунології та алергології протягом останніх років було показано, що серед Т-лімфоцитів периферичної крові людей є популяція клітин з регуляторними властивостями та фенотипом CD4+CD25+. Було відмічено, що саме цим клітинам належить особлива роль в пригніченні алогенної проліферації та синтезу цитокінів активованими CD4+CD25- Т-лімфоцитами. Отже, так звані супресорні або регуляторні Т-клітини здатні попереджувати розвиток аутоімунних реакцій та імунної відповіді під час імунізації алоантигенами в результаті пригнічення активності та чисельності Т-лімфоцитів [10, 14].

CD4+CD25+ Т-регуляторні клітини були також виявлені серед популяції Т-лімфоцитів периферичної крові хворих на atopічні захворювання шкіри та дихальних шляхів, а також показана їх здатність пригнічувати синтез цитокінів як Th1, так і Th2 клітинами під час активації Т-лімфоцитів [8]. Є дані, що алерген-специфічні Т-клітини, які експресують IL-10 та TGF- β (трансформуючий фактор росту), визначаються в основному серед популяції CD4+CD25+ Т-клітин. Збагачення клітинних культур Т-регуляторними клітинами призводило до підсилення супресії Т-клітин, індукованих специфічною імунотерапією. Відомо, що стимуляція синтезу IL-10 та TGF- β CD4+CD25+ Т-клітинами призводить до зменшення синтезу IgE на фоні стимуляції IgG4 та IgA. Результати проведених досліджень призвели до виникнення припущень про те, що імунна відповідь на алергени у здорових осіб та хворих з проявами алергії є результатом співвідношення між алергенспецифічними Т-регуляторними клітинами та Th2 клітинами [2, 9, 13].

Добре відомий той факт, що баланс між популяціями клітин залежить від процесів проліферації та апоптозу. Неодноразово було показано, що одним із патогенетичних механізмів розвитку алергічних захворювань (включаючи риніти та atopічну бронхіальну астму) є порушення процесів апоптозу серед різних популяцій лімфоцитів [5, 11, 12].

Отже, метою нашої роботи став аналіз зміни рівнів апоптозу CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин у хворих atopічними захворюваннями, а саме atopічною бронхіальною астмою, сенсibilізованих алергенами домашнього пилу, у порівнянні з показниками у практично здорових осіб.

Матеріали та методи

Для вирішення поставленої мети до основної групи були включені 6 пацієнтів віком 20–40 років на atopічну бронхіальну астму (АБА) легкого та середнього ступеню важкості в стадії ремісії, сенсibilізованих алергенами домашнього пилу. Відповідно, 6 практично здорових осіб склали групу порівняння. Вибірки пацієнтів були співставлені за віком та статтю.

Діагноз бронхіальної астми був встановлений на основі анамнестичних, клінічних даних, результатах лабораторних і функціональних методів обстеження та критеріях ефективності протиастматичної терапії.

Сенсibilізацію алергенами домашнього пилу діагностували на підставі комплексу алергологічних методів обстеження: збір алергологічного анамнезу, позитивного шкірного скарифікаційного тесту з алергенами домашнього пилу збагаченого дерматофагоїдними кліщами (*Dermatofagoides farine*) (виробництва МП "Імунолог", м. Вінниця, Україна).

Із дослідження виключали хворих із важким перебігом бронхіальної астми, а також пацієнтів, які отримували системні та інгаляційні кортикостероїди протягом останніх двох місяців. За 72 години до проведення забору крові був призупинений прийом теофілінів та антигістамінних препаратів.

Об'єктом дослідження була гепаринізована кров, забір якої проводили натщесерце за допомогою одноразових пластикових шприців із кубітальної вени.

Згідно методу використовували суспензію лімфоцитів, яку отримували з периферичної крові за стандартною методикою [1] шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну (густина 1,077 г/мл).

Для подальшого дослідження лімфоцити у кінцевій концентрації 2×10^6 /мл культивували у середовищі RPMI-1640 з глютаміном (Sigma, США), 10 % інактивованою телячою сироваткою ("Bio Mark Inc", Львів Україна), 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ГНЦЛС, Україна) при 37°C з стимулюючим агентом або з стерильним фосфатно-сольовим буфером в контрольних групах. Для специфічної стимуляції до інкубаційного середовища додавали алерген домашнього пилу, збагачений дерматофагоїдними кліщами у кінцевій концентрації 10 мкг/мл, який попередньо діалізували для видалення консервантів, час інкубації складав 96 годин [4]. Для контролю неспецифічну стимуляцію проводили за допомогою 4-форбол-12-миристат-13-ацетату (ФМА) (Sigma, США) у концентрації $8,1 \times 10^{-9}$ М [4]. Суспензію лімфоцитів інкубували з ФМА протягом 3 годин.

Для визначення фенотипу лімфоцитів периферичної крові були використані моноклональні антитіла (МкАТ) (мишині IgG) до поверхневих антигенів, які мічені різними флюорисцентними барвниками: до CD3 мічені FITC, до CD4 мічені PE-TR, до CD19 мічені RPE, до CD25 мічені RPE (Caltag, США). Для ізотипічного контролю використовували мишині IgG, кон'юговані FITC, RPE та PE-TR (Caltag, США).

Процеси апоптозу досліджували у відповідності до стадій його розвитку, згідно цього, експресію CD95 вивчали за допомогою антитіл до CD95, мічених TC та експресію Bcl-2 за допомогою антитіл до Bcl-2, мічених FITC. Розвиток апоптозу визначали за допомогою аннексину V міченого FITC (всі вищевказані антитіла виробництва Caltag, США) та за допомогою флюорисцентного барвника пропідіума йодіда (Sigma, США) [7].

Для визначення експресії поверхневих антигенів 10^5 мононуклеарів периферичної крові (МНПК) інкубували з специфічними МкАТ. Для визначення внутрішньоклітинного білка Bcl-2 МНПК фіксували 4 % розчином пармформальдегіду (Sigma, США) протягом 10 хвилин при

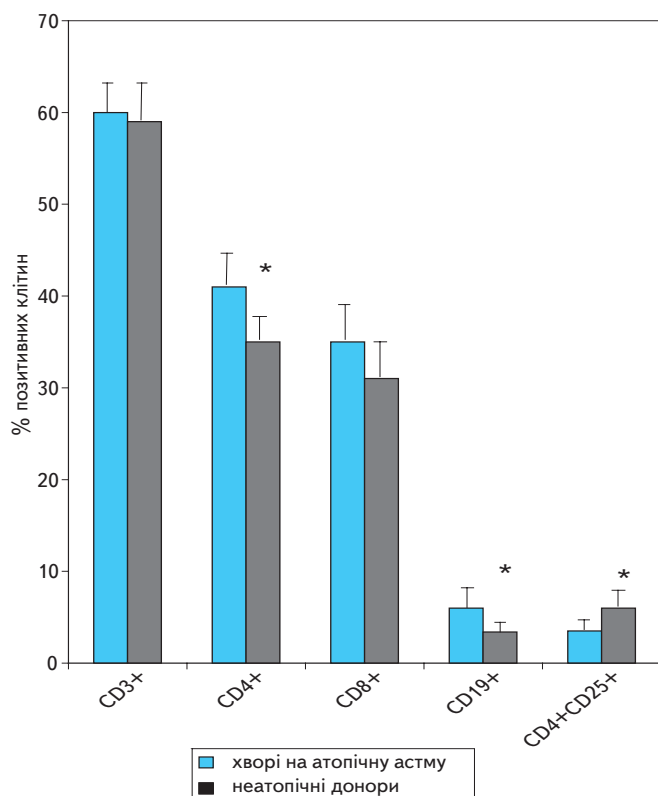


Рис. 1. Фенотип лімфоцитів хворих на atopічну бронхіальну астму та неатопічних донорів безпосередньо після виділення з периферичної крові. Статистично вірогідні зміни при $p < 0,05$

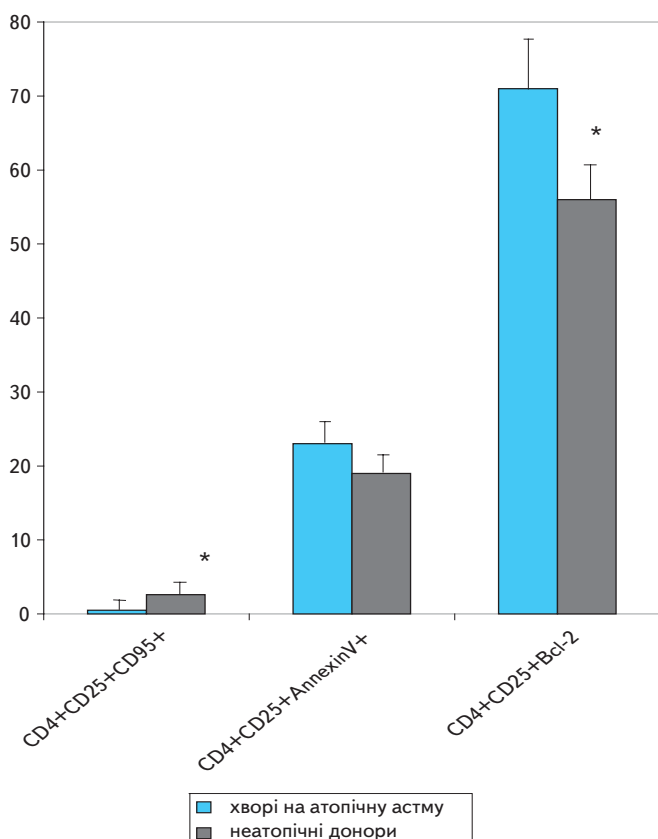


Рис. 2. Експресія маркерів апоптозу CD4+CD25+ Т-клітин хворих на atopічну бронхіальну астму та неатопічних донорів безпосередньо після виділення з периферичної крові. Для CD4+CD25+Bcl-2 Т-клітин показана середня інтенсивність флюорисценції, а для інших клітин — % позитивних клітин

4° С. Пермеабілізацію проводили за допомогою 0,1 % розчину сапоніну протягом 10 хвилин у темряві при кімнатній температурі.

Для виявлення змін постановку методик проводили, використовуючи суспензію лімфоцитів безпосередньо після виділення клітин, після неспецифічної та специфічної стимуляції паралельно з контрольними пробами.

Рівень апоптозу та фенотип лімфоцитів визначали аналізуючи проби на проточному цитофлюориметрі EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму "System II™ software". Для збудження флюорисценції використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм. Додатково до флюорисцентних параметрів проводили реєстрацію прямого та бокового світлорозсіювання клітин, що дозволяло виключати з аналізу конгломерати клітин та їх уламки.

Статистичну оцінку отриманих математичних результатів експерименту проводили за допомогою t-критерію Ст'юдента, використовуючи статистичний пакет програми "STATISTICA". При цьому обчислювали середнє арифметичне (M) та його похибку (m), отримані результати вважали вірогідними, якщо значення $p \leq 0,05$.

Отримані результати

Під час характеристики фенотипу лімфоцитів периферичної крові донорів та хворих на АБА відразу ж після виділення суспензії виявлена різниця рівнів CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин. Кількість цих клітин у хворих була значно нижчою у порівнянні з показниками здорових осіб. На відміну цього, рівень експресії CD4+ та CD19+ Т-клітин у пацієнтів був значно вищим. Під час досліджень кількості CD3+ та CD8+ Т-клітин не виявлено різниці між показниками у осіб даних груп (рис. 1).

Вивчення процесів апоптозу CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин відразу ж після виділення показали, що у хворих на АБА значно менша кількість клітин, які мали низьку експресію CD95 та високу Bcl-2. Під час визначення CD4+CD25+AnnexinV+ Т-клітин не було відмічено значної різниці між показниками основної групи та групи порівняння (рис. 2).

Після неспецифічної стимуляції клітин виявлені зміни процесів апоптозу CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин донорів та пацієнтів. А саме, після внесення РМА до інкубаційного середовища Т-регуляторні клітини практично здорових осіб відповідали підвищенням експресії CD95 та зниженням Bcl-2 (за середніми значеннями інтенсивності флюорисценції). А під час проведеного аннексін V-пропідіум йодід тесту показана стимуляція процесів апоптозу цих клітин (рис. 3). Аналогічні зміни серед CD4+CD25+ Т-клітин відмічені після стимуляції РМА у хворих на АБА.

Після проведеної специфічної стимуляції за допомогою алергенів домашнього пилу виявлена різниця відповіді Т-регуляторних клітин пацієнтів та донорів (рис. 4). Порівнюючи загальну кількість цих клітин, відмічено їх зниження у суспензії хворих на АБА через 96 годин після внесення специфічного антигену до інкубаційного середовища. Досліджуючи процеси апоптозу CD4+CD25+ Т-клітин виявлено, що у пацієнтів в присутності алергену, до якого вони сенсibilізовані, підвищується рівень апоптозу (без підсилення експресії CD95). На відміну цього, стимуляція антигенами домашнього пилу не впливала на загальну кількість та апоптоз CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин у практично здорових осіб.

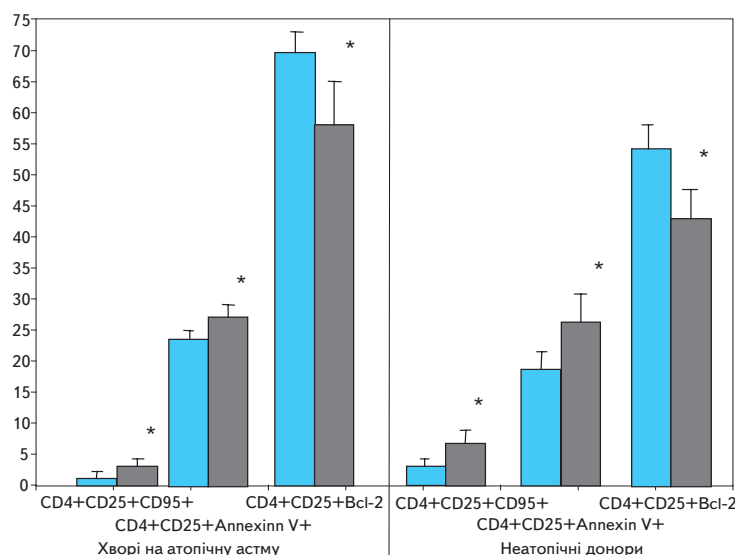


Рис. 3. Експресія маркерів апоптозу CD4+CD25+ Т-клітин після неспецифічної стимуляції за допомогою ФМА. Блакитні стовпчики показують середні контрольні значення в результаті інкубації з стерильним фосфатно-сольовим буфером, а сірі — з ФМА

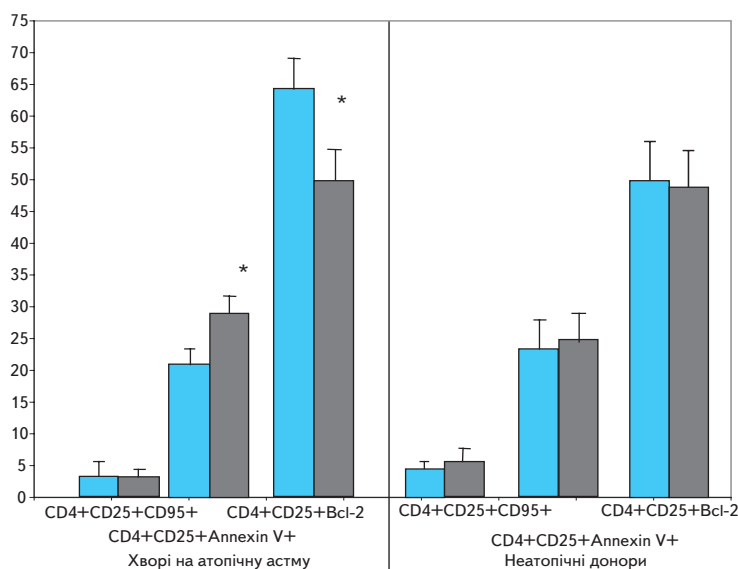


Рис. 4. Експресія маркерів апоптозу CD4+CD25+ Т-клітин після специфічної стимуляції алергеном домашнього пилу. Блакитні стовпчики показують середні контрольні значення в результаті інкубації з стерильним фосфатно-сольовим буфером, а сірі — з специфічним алергеном

Обговорення

У проведених нами дослідженнях була визначена роль процесів апоптозу Т-регуляторних клітин під час розвитку алергічної імунної відповіді. Нещодавно було показано, що процеси апоптозу імунокомпетентних клітин (моноцитів та лімфоцитів) відіграють важливу роль в регуляції імунних реакцій. Наприклад, у дослідженнях *in vitro* під час культивування моноцитів хворих на бронхіальну астму з алергеном, до якого вони сенсibilізовані, виявлено підсилення експресії поверхневих антигенів моноцитів у порівнянні з показниками здорових осіб або після проведеної специфічної імунотерапії у хворих на бронхіальну астму. Відмічено, що у хворих на АБА після проведеної специфічної імунотерапії значно вищий рівень апоптозу моноцитів у порівнянні з донорами або хворими, які отримували тільки лише базисну терапію. Таким чином, модуляція експресії CD14 на поверхні моноцитів та процесів апоптозу цих клітин може бути обумовлена алерген-індукованим механізмом [3].

Під час проведених наступних експериментальних досліджень впливу високих концентрацій алергену в культуральному середовищі виявлено зростання кількості CD4+IFN- γ + та CD8+IFN- γ + Т-клітин, а на відміну цього, низькі рівні алергенів не впливали на популяцію цих клітин. Показано, що високі концентрації алергенів стимулювали розповсюдження CD4+IFN- γ + Т-клітин, мічених CFSE. Є дані, що збільшення концентрації алергенів призводило до прямопропорційного збільшення рівня клітин в апоптозі, крім того, ці зміни переважно виявлені серед CD4+IL-4+ Т-клітин. HDM-індукована проліферація гальмувалась при зростаючих дозах алергенів, а під впливом IL-2 даний процес мав зворотній напрям. Отже, результати проведених досліджень свідчать, що індукція високими дозами алергенів диференціювання та апоптозу Т-клітин відіграє ключову роль у зсуві цитокінового профілю, що обґрунтовує синтез переважно IFN- γ . Таким чином, прийом препаратів, які зменшують реактивність Т-клітин під час алергічного запалення в дозах,

які перевищують природні екстракти, може призводити до підвищення ефективності специфічної імунотерапії [6].

Як відомо, Т-клітини, які складають основну популяцію клітинних інфільтратів під час atopічного/алергічного запалення, а також їх дисфункція, що обумовлена переважністю імунної відповіді за Th2 типом, відіграють важливу роль в патогенезі алергічних захворювань. У хворих з atopічним дерматитом виявлено циркулюючий шкірний лімфоцит-асоційований антиген на поверхні CD45RO+ Т-клітин, які володіють шкірно-специфічними властивостями хомінгу. Ці клітини представляють підтип Т лімфоцитів — активовані ефекторні клітини пам'яті, які експресують високі рівні Fas рецепторів і Fas лігандів на своїй поверхні та піддаються апоптозу, що індукований активацією. Свіже-виділені CLA+ CD45RO+ Т-клітини хворих на atopічні захворювання характеризуються особливими властивостями запуску апоптозу *in vivo*, а саме — зниженням прокаспаз та утворенням активної каспази 8. Наприклад, у хворих на atopічний дерматит Th1 клітини активованих Т ефекторних клітин пам'яті селективно піддаються апоптозу, що індукований активацією, який призводить до патологічного зсуву імунної відповіді в бік Th2 клітин. Крім того, підвищений рівень апоптозу *in vivo* цих клітин спостерігався переважно у хворих на atopічні захворювання і, практично, не відрізнявся у хворих на псоріаз, інфекційно-залежну бронхіальну астму, контактний дерматит, інфекційно-залежну форму atopічного дерматиту, у пацієнтів з підвищеною чутливістю до укусу бджіл та у практично здорових осіб. Отже, отримані результати визначають новий патогенетичний механізм розвитку імунної відповіді за Th2 типом у atopічних хворих [15].

Для досягнення поставленої перед нами мети були проаналізовані рівні апоптозу CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин у хворих atopічними захворюваннями, а саме АБА, сенсibilізованих алергенами домашнього пилу. Отримані результати свідчать, що CD4+CD25+ Т-регуляторні клітини хворих на АБА піддаються апоптозу, який індукований специфічним антигеном. Досліджений нами алергенспецифічний апоптоз Т-регуляторних клітин при atopічних захворюваннях, можливо, відіграє ключову роль у зниженні регуляторних цитокінів — IL-10 та TGF- β , які синтезуються цими клітинами. Отримані результатами підтверджувались літературними даними, які свідчать про зменшення кількості CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин в периферичній крові у хворих на atopічні захворювання [8].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що алергенспецифічний апоптоз CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин є одним із патогенетичних механізмів розвитку АБА.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лимфоциты: методы*: Пер. с англ. / Под. ред. Дж. Клауса. — Москва: Мир, 1990. — 395 с.
2. Akdis C. A., Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — Vol. 112. — P. 15–22.
3. *Allergen-dependent* CD14 modulation and apoptosis in monocytes from allergic patients / Monteseirin J., Bonilla I., Chacon P. et al. // *Allergy.* — 2003. — Vol. 58, №11. — P. 1027–1032.
4. Analysis of the CD4+ T cell responses to house dust mite allergoid / Kalinski P., Lebre M. C., Kramer D., de Long E. C. // *Allergy.* — 2003. — Vol. 58, №7. — P. 648–656.
5. *Eosinophil* apoptosis in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and with asymptomatic and symptomatic asthma / Foresi A., Teodoro C., Leone C. et al. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* — 2000. — Vol. 84, №4. — P. 411–416.
6. Gardner L. M., O'Hehir R. E., Rolland J. M. High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T Cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2004, Vol. 133. — P. 1–13.
7. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis / Strebel A., Harr T., Bachmann F. et al. // *Cytometry.* — 2001. — Vol. 43, № 2. — P. 126–133.
8. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production / Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — Vol. 111. — P. 862–868.
9. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy / Jutel M., Akdis M., Budak F. et al. // *Eur. J. Immunol.* — 2003. — Vol. 33. — P. 1205–1214.
10. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 / Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. et al. // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192. — P. 303–310.
11. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis / Grzegorzczak J., Kowalski M. L., Pilat A., Iwaszkiewicz J. // *Mediators Inflamm.* — 2002. — Vol. 11, № 4. — P. 225–233.
12. Induction of peripheral mononuclear cell apoptosis in asthmatic patients in remission / Noma T., Sugawara Y., Aoki K. et al. // *J. Asthma.* — 2002. — Vol. 39, № 7. — P. 591–601.
13. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy / Akdis C. A., Blesken T., Akdis M. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 102. — P. 98–106.
14. Shevach E. M. Regulatory T cells in autoimmunity // *Annu. Rev. Immunol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 423–449.
15. T-helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector cells / Akdis M., Trautmann A., Klunker S. et al. // *FASEB J.* — 2003, Vol. 17. — P. 1026–1035.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ CD4+CD25+ Т-КЛІТИН У ХВОРИХ АТОПІЧНОЮ БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ

І. П. Кайдашев, Н. Л. Куценко

Резюме

Метою нашої роботи був аналіз зміни рівнів апоптозу CD4+CD25+ Т-регуляторних клітин у хворих atopічною бронхіальною астмою, сенсibilізованих алергенами домашнього пилу. Мононуклеарі периферичної крові пацієнтів (n=6) та донорів (n=6) стимулювали специфічним антигеном (*Dermatofagoides farinae*), а неспецифічну стимуляцію проводили за допомогою форболмиристатацетату. Фенотип лімфоцитів та апоптоз Т-регуляторних клітин визначали на проточному цитофлюориметрі використовуючи моноклональні антитіла до CD4, CD25, CD95 та Bcl-2. Також проводили аннексін V-пропідіум йодид тест. У atopічних хворих CD4+CD25+ Т-регуляторні клітини відповідали підсиленню апоптозу в присутності антигену, до якого вони сенсibilізовані. Дослідження показують, що алергенспецифічний апоптоз Т-регуляторних клітин може бути залученим в патогенезі atopічної астми.

THE STUDY OF APOPTOSIS OF CD4+CD25+ T-CELLS IN PATIENTS WITH ATOPIC ASTHMA

I. P. Kaidashev, N. L. Kutsenko

Summary

The aim of this study was to analyze the change of apoptosis level of CD4+CD25+ regulatory T-cells in patients with atopic asthma having dust mite allergy. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with atopic asthma (n=6) and from healthy donors (n=6) were stimulated by specific allergen (*Dermatofagoides farinae*) and by phorbolmyristateacetate. PBMC were labeled with anti-CD4, CD25, CD95 and Bcl-2 monoclonal antibodies. AnnexinV-propidium iodide tests were performed. Lymphocyte subpopulations and apoptosis were analyzed by flow cytometry. There was no response of CD4+CD25+ T-cells of non-atopic individuals to specific allergen. However, in the presence of specific allergen, CD4+CD25+ T-cells from atopic patients demonstrated an increase in apoptosis. This study demonstrates that allergen-specific apoptosis of regulatory CD4+CD25+ cells might be involved in the pathogenesis of atopic asthma.