

## Уровень экспрессии CD95-рецепторов апоптоза лимфоцитов как критерий ранней диагностики бронхиальной астмы у детей

С.Т.Валиева, А.И.Гасанов, И.В.Киреев, А.А.Маликова

Азербайджанский государственный институт усовершенствования врачей им. А.Алиева, кафедра педиатрии, Национальный фармацевтический университет, кафедра фармакотерапии  
Баку, Азербайджан, Харьков, Украина

Целью обследования было определение диагностической значимости апоптоза лимфоцитов периферической крови у детей с бронхообструктивным синдромом. В результате исследования было выявлено, что бронхиальная астма и дерматореспираторный синдром у детей характеризуются повышенной устойчивостью лимфоцитов периферической крови к спонтанному апоптозу ( $46,0 \pm 21,8$ ;  $p < 0,01$  и  $32,6 \pm 18,6$ ;  $p < 0,0001$  соответственно). Для детей с рецидивирующим бронхитом характерна сопоставимая с группой здоровых детей ( $56,7 \pm 8,0$  и  $59,8 \pm 9,6$  соответственно) экспрессия CD95-маркера апоптоза лимфоцитов. Учитывая отрицательную корреляционную зависимость ( $\rho = -0,8$ ) между концентрациями CD95-маркера апоптоза и IgE, рекомендуется с целью ранней диагностики бронхиальной астмы определение уровня CD95-маркера апоптоза лимфоцитов у детей с гипериммуноглобулинемией E.

**Ключевые слова:** дети, астма, ранняя диагностика, апоптоз лимфоцитов.

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярно генетических аспектов регуляции программируемой клеточной гибели (апоптоза) в последнее время стало одним из наиболее развивающихся направлений биомедицинских исследований [1, 2, 4, 14]. В современном представлении апоптоз — это активная гибель клетки, являющаяся результатом реализации ее генетической программы и требующая затрат энергии и синтеза белка. Возрастающий

интерес к процессу апоптоза определяется взаимосвязью нарушения его регуляции с большинством заболеваний, при этом особый интерес представляет ингибирование механизмов апоптоза в патогенезе атопических заболеваний [3, 5, 6, 8, 9].

Проблема апоптоза иммунокомпетентных клеток при бронхиальной астме (БА) была изучена рядом авторов на взрослых пациентах [7-9, 14]. Данные, представленные в научной литературе, являются не только различными, но и диаметрально противоположными [2, 3, 5, 7, 8]. В педиатрии этот вопрос остается мало изученным.

Целью исследования явилось определение диагностической значимости апоптоза иммунокомпетентных клеток — лимфоцитов периферической крови — у детей с бронхообструктивным синдромом.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 24 ребенка с БА, 20 детей с дерматореспираторным синдромом (ДРС), 20 детей с рецидивирующим бронхитом (РБ), контрольную группу составили 18 здоровых детей.

При исследовании апоптоза лимфоцитов, учитывая, что применение гормональных препаратов может исказить результаты обследования, критериями для включения в исследование были:

- соответствие показателям легкой и средней степени тяжести БА;
- отсутствие адекватной степени тяжести базисной противовоспалительной терапии (GINA, 2002) в течение 4 недель до включения в исследование;
- отсутствие сопутствующей соматической патологии.

ТАБЛИЦА 1  
Концентрация CD95-рецептора в сыворотке крови здоровых детей, детей с РБ, БА и ДРС

Группы обследуемых пациентов	Концентрация CD95-маркера апоптоза	Достоверность по сравнению с контрольной группой
Здоровые дети (n=18)	59,8±9,6	
РБ (n=20)	56,7±8,0	p=0,2
БА (n=24),	49,2±16,1	p<0,01
ДРС (n=20)	32,6±18,6	p<0,0001

В качестве симптоматической терапии был использован сальбутамол сульфат (Вентолин, GSK) в дозе 100 мкг в режиме по требованию.

Для исследования показателей иммунной системы использована кровь, взятая у детей натощак, не ранее чем через 1 мес. после окончания любого инфекционного процесса или ревакцинации. Для оценки специфического клеточного звена иммунной системы использованы коммерческие моноклональные антитела, меченые ФИТЦ фирмы «Сорбент» (Россия) выявляющие активированные лимфоциты — апоптоз клеток (CD95+). Использовали методику, прилагаемую к данной панели моноклональных антител. Микроскопию проводили на микроскопе фирмы «Люам РІ».

Определение уровня IgE в смешанной слюне проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора «Е-ИФА»-Biochek (USA) на аппарате Bio Screen MS-500.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки уровня CD95-маркера апоптоза в сыворотке крови всех исследуемых детей представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, у больных с ДРС выявлено выраженное снижение (почти в 2 раза) экспрессии CD95-рецептора апоптоза на лимфоцитах периферической крови по сравнению с группой здоровых детей. У детей с БА также выявлено статистически значимое отличие. Обсуждая выявленное при atopических заболеваниях снижение экспрессии CD95-антигена на лимфоцитах, следует отметить, что это является, по-видимому, отражением нарушения нормального функционирования системы Fas/FasL. В связи с этим весьма интересны данные литературы о повышении содержания растворенного Fas-рецептора (sFas) в сыворотке крови больных БА [8, 9], что, вероятно, можно связать с утратой Fas-рецепторного аппарата

ТАБЛИЦА 2  
Концентрации общего IgE в сыворотки крови обследуемых детей

Группы обследуемых	Концентрация IgE МЕ/мл
РБ (n=20)	35,2±5,6
БА (n=24),	383,2±280,6*
ДРС (n=20)	511,7±256*

Примечание: \* —  $p < 0,0001$  по сравнению с группой детей с РБ.

эффeкторными клетками в условиях формирования воспаления при БА. Не обнаружено увеличение количества Fas-рецепторов не только на лимфоцитах периферической крови, но и на эозинофилах у больных БА [8, 14].

Таким образом, можно предположить, что снижение Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов является одной из причин персистенции воспаления при БА.

В противоположность этому, у детей с РБ существенных отличий от контрольной группы по указанному показателю не выявлено. По нашему мнению, это обусловлено участием в запуске Fas-опосредованного сигнального пути апоптоза таких повреждающих агентов, как вирусы, бактериальные токсины, температура, свободные радикалы. Известно также, что многие антибиотики являются факторами, участвующими в индукции опосредованного апоптоза клетки [10, 11]. Интересны в связи с этим полученные нами данные корреляционного анализа, демонстрирующие наличие высокой положительной корреляционной связи между процентом экспрессированных CD95-рецепторов и фактом проведения антибактериальной терапии в группе больных РБ ( $r=0,81$ ;  $p<0,05$ ). Заслуживают также внимания данные корреляционного анализа, отражающие наличие воспалительного процесса у больных указанной группы: положительные корреляционные связи между уровнем экспрессии CD95-рецепторов на поверхности лимфоцитов и количеством сегментоядерных лейкоцитов в клиническом анализе крови ( $r=0,68$ ;  $p<0,05$ ).

Известно, что одним из основных молекулярных маркеров atopии является IgE, гиперпродукция которого вызывает проявление основных аллергических симптомов [12, 13]. В связи с участием апоптоза в увеличении продолжительности жизни клеток воспаления, в частности IgE-продуцирующих клеток, базофилов, эозинофилов при аллергических заболеваниях, нам представилось интересным изу-

чить взаимосвязь системы IgE и CD95-маркера апоптоза, регулирующей процессы программируемой клеточной гибели.

Полученные нами сведения по изучению концентрации общего IgE в сыворотке крови в группах обследования представлены в табл. 2.

Было обнаружено значительное повышение содержания IgE у всех детей с аллергическими заболеваниями, однако максимальные значения гипериммуноглобулинемии E выявлены у детей с ДРС. Мы полагаем, что одной из возможных причин наблюдаемого повышения IgE, а также вариабельности его уровней в зависимости от вида аллергопатологии может быть нарушение механизмов программируемой клеточной гибели. Однако достаточной корреляции между уровнем CD95-маркера и IgE во всех группах обследования нами не обнаружено.

Для более глубокого изучения взаимосвязи CD95 и системы IgE было проведено дополнительное разделение детей по признаку содержания IgE: с уровнем IgE, не превышающим 100 МЕ/мл (среднее — 84,6 МЕ/мл; n=16); с содержанием общего IgE выше 100 МЕ/мл (среднее — 503,5 МЕ/мл; n=28), с последующим анализом концентрации CD95-маркера для каждой из сформированных групп.

В результате исследования выявлено, что при повышении содержания в периферической крови уровня общего IgE происходило уменьшение уровня CD95-клеток ( $31,9 \pm 3,2\%$ ;  $p < 0,01$ ) относительно детей с нормальным содержанием IgE ( $57,7 \pm 8,42\%$ ). Возможно, это отражает процессы регуляции экспрессии Fas-рецептора со стороны цитокинов, продуцируемых Th2, что блокирует передачу сигналов апоптоза в клетки, в том числе и IgE-продуцирующие, и влечет за собой поддержание продукции IgE. Выявлена отрицательная зависимость между концентрациями CD95-маркера апоптоза и IgE ( $r = -0,8$ ;  $p < 0,03$ ). Такая корреляционная связь позволяет предположить, что при аллергическом воспалении с участием системы IgE имеет место торможение апоптоза лимфоцитов, что можно рассматривать с точки зрения участия апоптоза в патогенезе БА. Устойчивость лимфоцитов к апоптозу является, по-видимому, предпосылкой их длительной персистенции в очаге хронического воспаления в органах-мишенях.

## ВЫВОДЫ

Бронхиальная астма и дерматореспираторный синдром у детей характеризуются повышенной устойчивостью лимфоцитов пери-

ферической крови к спонтанному апоптозу ( $46,0 \pm 21,8$ ;  $p < 0,01$  и  $32,6 \pm 18,6$ ;  $p < 0,0001$  соответственно) по сравнению со здоровыми детьми ( $59,8 \pm 9,6$ ), сопровождаются снижением экспрессии CD95-рецепторов на поверхности лимфоцитов, что может определять патогенетическую значимость нарушений апоптоза в персистенции аллергического воспаления.

Для детей с рецидивирующим бронхитом характерна сопоставимая с группой здоровых детей ( $56,7 \pm 8,0$  и  $59,8 \pm 9,6$  соответственно) экспрессия CD95-маркера апоптоза лимфоцитов.

Учитывая выявленную отрицательную корреляционную зависимость ( $\rho = -0,8$ ) между концентрациями CD95-маркера апоптоза и IgE, рекомендуется с целью ранней диагностики бронхиальной астмы определение уровня CD95-маркера апоптоза лимфоцитов у детей с гипериммуноглобулинемией E.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 320 с.
2. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. и соавт. Апоптоз лимфоцитов при атопической бронхиальной астме // Пульмонология. — 2003. — №5. — С. 38-44.
3. Минеев В.Н., Нестерович И.И., Оранская Е.С. и соавт. Апоптоз и активность рибосомальных цистронов клеток периферической крови при бронхиальной астме // Аллергология. — 2003. — №1. — С. 15-19.
4. Григорьева Т.Ю., Никонова М.Ф., Варфоломеева М.И. и соавт. Неравномерное вовлечение в активационный апоптоз Т-лимфоцитов субклассов CD4, CD8 и высокая чувствительность к нему CD30 клеток периферической крови здоровых лиц и больных с иммунопатологией // Иммунология. — 2002. — №5. — С. 262-267.
5. Мамонтова Т.В., Кайдашев И.П. Новые аспекты апоптоза мононуклеарных клеток в патогенезе атопической бронхиальной астмы // Аллергология. — 2005. — №4. — С. 15-23.
6. Невзорова В.А., Суворенко Т.Н., Коновалова Е.Н. Апоптоз и воспаление при бронхиальной астме // Терапевт. архив. — 2001. — №12. — С. 92-96.
7. Erjefalt J.S., Person C.G.A. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 161. — P. 2074-2085.
8. Fahy J.E., Quan S.F., Bloom J.W. et al. Fas receptor expression on asthmatic eosinophils // Res. Commun. Mol. Patol. Pharmacol. — 1998. — Vol. 102 (1). — P. 93-96.
9. Kato M., Nozaki Y., Yoshimoto T. et al. Different serum soluble Fas levels in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma // Allergy. — 1999. — Vol. 54 (12). — P. 1299-1302.

10. Korppi M. Management of bacterial infections in children with asthma // Expert Rev. Anti Infect. Ther. — 2009. — №7ю — P. 869-877.
11. Lehtinen P., Jartti T., Virkki R. et al. Bacterial coinfections in children with viral wheezing // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 25. — P. 463-469.
12. Silvestri M., Pistorio A., Battistini E. et al. IgE in childhood asthma: relevance of demographic characteristics and polysensitisation. <http://adc.bmj.com/content/early/2010/07/22/adc.2009.163667.abstract>
13. Owen C.E. Immunoglobulin E: role in asthma and allergic disease: lessons from the clinic // Pharmacol. Ther. — 2007. — Vol. 113. — P. 121-133.
14. Simon H.-U., Alam R. Regulation of eosinophil apoptosis: transduction of survival and death signals // Intern. Arch. of Allergy and Immunol. — Vol. 118. — P. 7-14.

**С.Т.Валієва, А.І.Гасанов, І.В.Кіреєв, А.А.Малікова. Рівень експресії CD95-рецепторів апоптозу лімфоцитів як критерій ранньої діагностики бронхіальної астми у дітей. Азербайджан, Баку.**

**Ключові слова:** діти, астма, рання діагностика, апоптоз лімфоцитів.

Метою обстеження було визначення діагностичної значущості апоптозу лімфоцитів периферичної крові у дітей з бронхообструктивним синдромом. У результаті дослідження було виявлено, що бронхіальна астма і дерматореспіраторний синдром у дітей характеризуються підвищеною стійкістю лімфоцитів периферичної крові до спонтанного апоптозу ( $46,0 \pm 21,8$ ;  $p < 0,01$  і  $32,6 \pm 18,6$ ;  $p < 0,0001$  відповідно). Для дітей з рецидивним бронхітом характерна співставлена з групою здорових дітей ( $56,7 \pm 8,0$  та  $59,8 \pm 9,6$  відповідно) ек-

спресія CD95-маркера апоптозу лімфоцитів. З огляду на негативну кореляційну залежність ( $\rho = -0,8$ ) між концентраціями CD95-маркера апоптозу та IgE рекомендується з метою ранньої діагностики бронхіальної астми визначення рівня CD95-маркера апоптозу лімфоцитів у дітей з гіперімунноглобулінемією E.

**S.T.Valiev, A.I.Gasanov, I.V.Kireev, A.A.Malikov. The level of expression of CD95-receptor lymphocyte apoptosis as a measure of early diagnosis of bronchial asthma in children. Azerbaijan, Baku.**

**Key words:** children, asthma, early diagnosis, apoptosis of lymphocytes.

The target of the inspection was the definition of the diagnostic importance of apoptosis of peripheral blood lymphocytes at children with obstructive bronchitis syndrome. As a result of research it has been revealed that a bronchial asthma and dermatorespiratory syndrome at children are characterized by the raised stability of peripheral blood lymphocytes to spontaneous apoptosis ( $46,0 \pm 21,8$ ;  $p < 0,01$  and  $32,6 \pm 18,6$ ;  $p < 0,0001$  respectively). Expression of CD95-marker of apoptosis of lymphocytes is characteristic for children with recurrent bronchitis comparable to the group of healthy children ( $56,7 \pm 8,0$  and  $59,8 \pm 9,6$  respectively). Considering negative correlation dependence ( $\rho = -0,8$ ) between concentration CD95-marker of apoptosis and IgE, definition of level CD95-marker of lymphocytes apoptosis at children with hyperimmunoglobulinemia E is recommended for the purpose of early diagnostics of bronchial asthma.

Надійшла до редакції 07.02.2011 р.