© Мамонтова Т.В.
УДК 577.7+612.112.94+616.248

РОЛЬ БІЛКІВ BCL-2 І P53 В РЕГУЛЯЦІЇ АПОПТОЗУ, ІНДУКОВАНОГО ЗВЯЗУВАННЯМ МОЛЕКУЛ МНС І ТА ІІ КЛАСІВ В МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИНАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА АТОПІЧНУ БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

Мамонтова Т.В.
Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики, м. Полтава

Апоптоз играет ключевую роль в патогенезе атопической бронхиальной астмы (АБА). Молекулы МНС I и II классов участвуют в активации апоптотических сигналов в лимфоцитах. Цель работы определить влияние связывания молекул МНС I и II классов с моноклональными антителами (мкАТ) на апоптоз, экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка p53 в мононуклеарных клетках периферической крови (МНПК) больных АБА. Показано, что активация молекул МНС I класса анти-HLA-A,B,C мкАТ вызывала резистентность к апоптозу, повышение экспрессии белков Bcl-2 и/или p53 в МНПК больных АБА и здоровых людей в присутствии сыворотки больных АБА. Активация молекул МНС II класса анти-HLA-DR мкАТ вызывало устойчивость к апоптозу, повышение экспрессии белка Bcl-2 в МНПК больных АБА и здоровых людей в присутствии аутологических сывороток. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о резистентности к МНС I- и МНС II-индуцированному апоптозу при АБА, что обусловлено активацией антиапоптотического белка Bcl-2 и регуляторным воздействием растворимых факторов сыворотки. Данная устойчивость к МНС I- и МНС II-опосредованному апоптозу при АБА может быть важным элементом патогенеза заболевания, поскольку дает возможность клеткам персистировать в органах мишенях, вызывая или поддерживая аллергическое воспаление.

Ключові слова: апоптоз, мононуклеарные клетки периферической крови, атопіческая бронхиальная астма

Вступ

Апоптоз або програмована клітинна загибель є фундаментальним біологічним процесом, який спрямований на підтримання гомеостазу клітин. Дисбаланс в системі регуляції апоптозу лежить в основі розвитку ряду захворювань, асоційованих переважно з його пригніченням або з стимулюванням. Роботами останніх років доведено, що порушення апоптозу лімфоцитів є одним із провідних факторів розвитку хронічного запалення дихальних шляхів при атопічній бронхіальній астмі (АБА) [1, 2]. Гіперактивація $CD45^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ Т- та В-лімфоцитів є основним патологічним критерієм АБА, тому тривале перебування і накопичення активованих клітин в органах-мішенях пов'язують з пригніченням апоптозу [3]. Отримані нами дані підтверджують таку можливість і свідчать про важливу роль в регуляції апоптозу анти- та проапоптотичних білків, Bcl-2 та p53, в мононуклеарних клітинах периферичної крові (МНПК) хворих на АБА [4]. Але, механізми стійкості МНПК до апоптозу залишаються повністю не розкритими.

Молекули головного комплексу гістосумісності або МНС (Major Histocompatibility Complex) І та ІІ класів відіграють ключову роль не лише у антигенній презентації пептидів, але також у трансдукції активаційних сигналів, зокрема проліферації, диференціювання та апоптозу [5]. Роботи останніх років переконливо доводять, що зв'язування молекул МНС І та ІІ класів з відповідними лігандами, моноклональними антитілами (мкАТ), молекулами CD8 і CD4 відповідно, суперантигенами призводить до індукції апоптозу у Т- і В-лімфоцитах, моноцитах, епітеліальних, дендритних та інших клітинах [6, 7]. Чутливість клітин до апоптозу, індукованого активацією молекул МНС І та ІІ класів залежить від стану активації, виду костимуляції та впливу цитокінів. Хоча, механізми, які лежать в основі МНС І- та МНС ІІ-опосередкованого апоптозу залишаються не достатньо вивченими, проте встановлено, що дана форма запрограмованої клітинної смерті відрізняється від класичного апоптозу, опосередкованого через рецептори Fas (CD95/APO-1), оскільки проходить каспазо-незалежними та каспазо-залежними сигнальними шляхами, з проявом у клітинах типових морфологічних змін [8, 9]. В зв'язку з цим, визначення сигналів і механізмів, які активують та регулюють апоптоз при АБА є актуальним напрямком сучасних досліджень.

Мета дослідження – визначити вплив зв'язування молекул МНС І та ІІ класів з моноклональними антитілами (мкАТ) на апоптоз, експресію антиапоптотичного білка Bcl-2 і проапоптотичного білка p53 в МНПК хворих на АБА і здорових людей.

Матеріали і методи дослідження

Обстежено 25 хворих на АБА (16 чоловіків та 9 жінок) віком 16-46 років. Всі хворі на АБА мали позитивні шкірні проби до екстрактів загальних аероалергенів (Імунолог, Україна). За 72 години до забору зразків крові хворі на АБА припиняли приймати кортикостеро-

їди, метилоксантини і антигістамінні препарати. Контрольну групу склали 25 практично здорових людей (11 чоловіків та 14 жінок) віком 16-45 років, з негативними шкірними пробами на аероалергени і відсутнім алергологічним анамнезом.

МНПК виділяли із гепаринізованої венозної крові у градієнті густини фікол-верографіну (1,077 г/мл). Визначали життєздатність МНПК при підрахунку з трипановим синім. МНПК (1-2 х 10^6 клітин/мл) вносили по 0,1 мл в 96-луночні планшети і культивували в 199 середовищі (РАМН, институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Росія) з 100 мкг/мл гентаміцину сульфату та з додаванням у паралелі 10% (за об'ємом) термоінактивованих сироватки ембріонів телят (СЕТ), сироватки хворих на АБА або здорових людей протягом 24 годин при 37˚С. МНПК інкубували з мишачими анти-людськими-HLA–A,B,C (ізотип IgG_{2a}, клон BRA-23/9), мишачими анти-людськими-HLA–DR мкАТ (ізотип IgG_3, клон ІПО-10), у дозі 10 мкг/10^6 клітин/мл (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Кавецького НАН України).

Для оцінки морфології ядер використовували забарвлення клітин ДНК-тропним барвником-флуорохромом Hoechst-33342 (у концентрації 0,1 мкг/мл; Sigma, США) і підраховували на флуоресцентному мікроскопі ЛЮМАМ-Р-8 (ЛОМО, Росія) [10]. Додатково, для встановлення морфологічних змін в клітинах використовували забарвлення за методом Мая–Грюнвальда–Романовського-Гімзи і підраховували на світловому мікроскопі. Враховували МНПК (%), які мали морфологічні ознаки апоптозу: конденсація і фрагментація хроматину, наявність апоптотичних тілець. Необхідно підкреслити, що саме морфологічна оцінка є стандартом ідентифікації і кількісної оцінки апоптозу [11].

Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних антигенів bcl-2 та p53 використовували імуноцитохімічний метод [10]. Цитоцентрифужні препарати фіксували у парах 10 % розчину нейтрального формаліну протягом 15 хвилин, потім здійснювали регідратацію у фосфатно-сольовому буфері (pH 7,2-7,4). Далі для блокування ендогенної клітинної пероксидази препарати занурювали в 0,3% розчин H_2O_2 на 5 хв. Пермеабілізацію клітин та демаскування антигену проводили із застосуванням технології мікрохвильової обробки у розчині цитратного буфера (pH 6,0). Препарати послідовно інкубували з первинними антитілами проти білка Bcl-2 (клон 124, субклас IgG_1, DAKO) або проти білка p53 (клон DO-7, субклас IgG_{2b}, DAKO) протягом 24 годин при 4˚С, потім з вторинними біотинільованими антитілами (IgG, Sigma) протягом 1,5 години при 37˚С, а потім з комплексом стрептавідин-біотин-пероксидаза (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit, Sigma) протягом 1,5 години при 37˚С. На препарати наносили 3-аміно-9-етилкарбазол (АЕК), який формує червоне забарвлення на місці цільового антигену. Контрастували ядра клітин 2% розчином метилового зеленого протягом 1 хвилини. Під мікроскопом оцінювали ядерну експресію p53 і цитоплазматичну експресію Bcl-2 в досліджуваних МНПК. Для кількісного вираження ступеня експресії білків Bcl-2 та p53, згідно загальноприйнятого в імуноцитохімії принципу Astaldi, обраховували середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) [10]. Негативним контролем специфічності зв'язування слугували препарати, де замість первинних мкАТ інкубація проводилась з неімунною сироваткою тварин – донорів специфічних антитіл (Negative control reagent, DAKO). Результати фарбування у цій ділянці були негативними. Для оцінки фонового забарвлення другими антитілами використовували вищеописаний метод, але без інкубування препаратів у розчині первинних антитіл. У цьому випадку також контролювали виявлення неспецифічного забарвлення ендогенної пероксидази.

Фрагментацію ДНК виявляли шляхом виділення її з МНПК, згідно інструкції комплекту реагентів для виділення ДНК (НВФ "ДНК-Технологія"; Росія) і аналізували методом електрофорезу в 2% гелі агарози з візуалізацією в УФ-світлі після фарбування етидіумом бромідом [13].

Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням методів хі-квадрат, парного та двохвибіркового t-тесту Ст'юдента, кореляційного аналізу Пірсона за допомогою програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). У всіх серіях досліджень результати вважали вірогідними при значеннях $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Нами досліджений вплив зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ з молекулами МНС I класу, анти-HLA-DR мкАТ з молекулами МНС II класу та сироваткових факторів (СЕТ, хворих на АБА або здорових людей) на рівень апоптозу в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Результати досліджень продемонстрували, що зв'язування молекул МНС I та II класів з анти-HLA-A,B,C мкАТ та анти-HLA-DR мкАТ, відповідно, супроводжується морфологічними змінами (конденсація і фрагментація хроматину, утворення апоптотичних тілець), які є типовими для розвитку апоптозу в клітинах.

Встановлено (рис. 1), що зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення у середовище СЕТ викликало вірогідне підвищення рівня апоптозу в МНПК хворих на АБА, та навпаки, вірогідне зниження в МНПК здорових людей. Внесення у середовище культивування сироватки хворих на АБА призвело до вірогідного пригнічення рівня апоптозу, індукованого анти-HLA-A,B,C мкАТ як в МНПК хворих на АБА, так і в МНПК здорових людей. Виявлено, що внесення в середовище культивування аутологічної сироватки призвело до вірогідного підвищення рівня апоптозу, індукованого анти-HLA-A,B,C мкАТ в МНПК здорових людей. Водночас, внесення сироватки здорових людей в середовище культивування не вплинуло на зміну рівня апоптозу, індукованого зв'язуванням анти-HLA-A,B,C мкАТ в МНПК хворих на АБА.

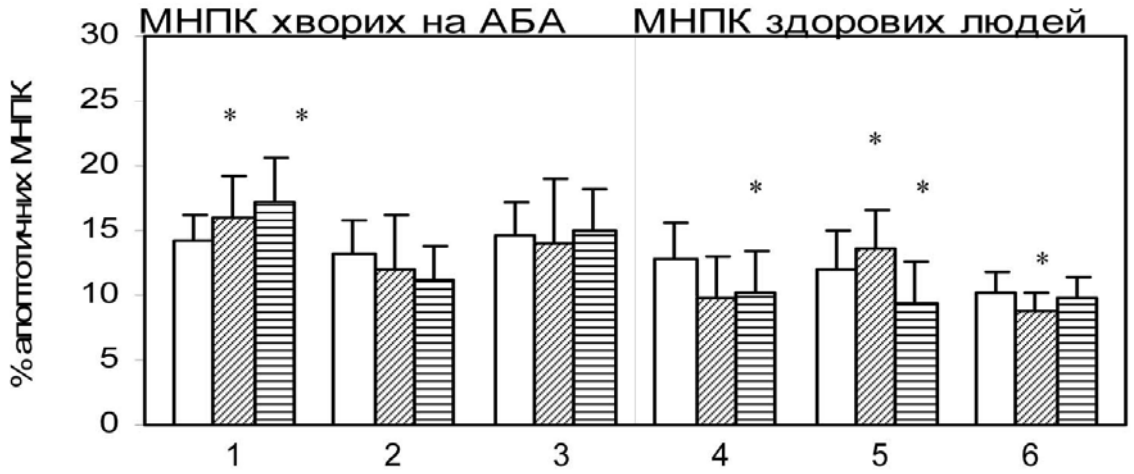

Рис. 1. Відсоток апоптотичних МНПК хворих на атопічну бронхіальну астму (АБА) та здорових людей. МНПК інкубували у середовищі (стовпчики без штрихів) або у середовищі із додаванням анти-HLA-A, B, C моноклональних антитіл (мкАТ) (стовпчики з косими штрихами), анти-HLA-DR мкАТ (стовпчики з горизонтальними штрихами) та з паралельним додаванням сироватки ембріонів телят (СЕТ) (1, 4), сироватки хворих на АБА (2, 5) та сироватки здорових людей (3, 6). В кінці інкубації МНПК забарвлювали за методом Мая-Грюнвальда-Романовського-Гімзи.

*Примітка: по осі абсцис – сироватки, що додавались до інкубаційного середовища, по осі ординат – відсоток апоптотичних клітин; результати представлені у вигляді середнього арифметичного значення та середнього квадратичного відхилення вибірки. Зірочка вказує * p < 0,05 у порівнянні з контрольною серією (тут і далі на рис. 2, 3).*

Встановлено, що зв'язування анти-HLA-DR мкАТ викликало лише відновлення рівня апоптозу в МНПК хворих на АБА, що на перший погляд не залежало від виду внесеної сироватки. Аналіз даних показав, що внесення сироватки хворих на АБА до середовища у порівнянні з іншими сироватками викликало вірогідне пригнічення рівня апоптозу, індукованого анти-HLA-DR мкАТ в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Внесення у середовище культивування СЕТ або аутологічної сироватки призвело до вірогідного паралельного пригнічення рівня апоптозу, індукованого зв'язуванням анти-HLA-DR мкАТ в МНПК здорових людей.

Вивчено вплив зв'язування молекул МНС I та II класів з анти-HLA-A,B,C та анти-HLA-DR мкАТ і сироваткових факторів на рівень експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 та проапоптотичного білка p53 в МНПК хворих на АБА та здорових людей (рис. 2, 3).

Виявлено, що зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення СЕТ до середовища призвело до вірогідного пригнічення рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА, але не змінило його в МНПК здорових людей. Зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення сироватки хворих на АБА до середовища вірогідно підвищило рівень експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Навпаки, зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення сироватки здорових людей вірогідно не вплинуло на рівень експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА та здорових людей.

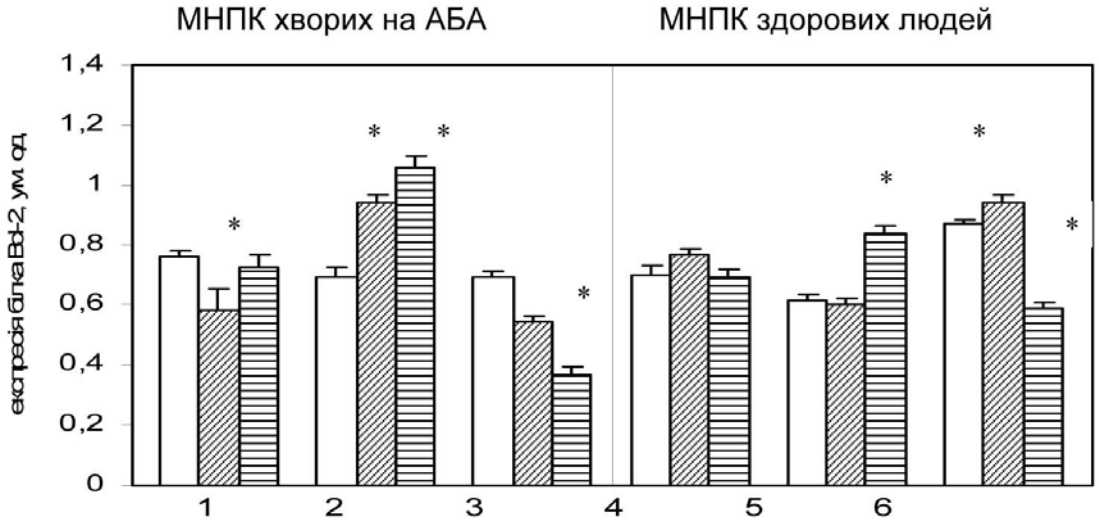

Рис. 2. Експресія антиапоптотичного білка Bcl-2 (ум. од.) в МНПК хворих на АБА та здорових людей визначена імуноцитохімічним методом. МНПК інкубували у середовищі (стовпчики без штрихів) або у середовищі із додаванням анти-HLA-A, B, C мкАТ (стовпчики з косими штрихами), анти-HLA-DR мкАТ (стовпчики з горизонтальними штрихами) та з паралельним додаванням СЕТ (1, 4), сироватки хворих на АБА (2, 5) та сироватки здорових людей (3, 6).

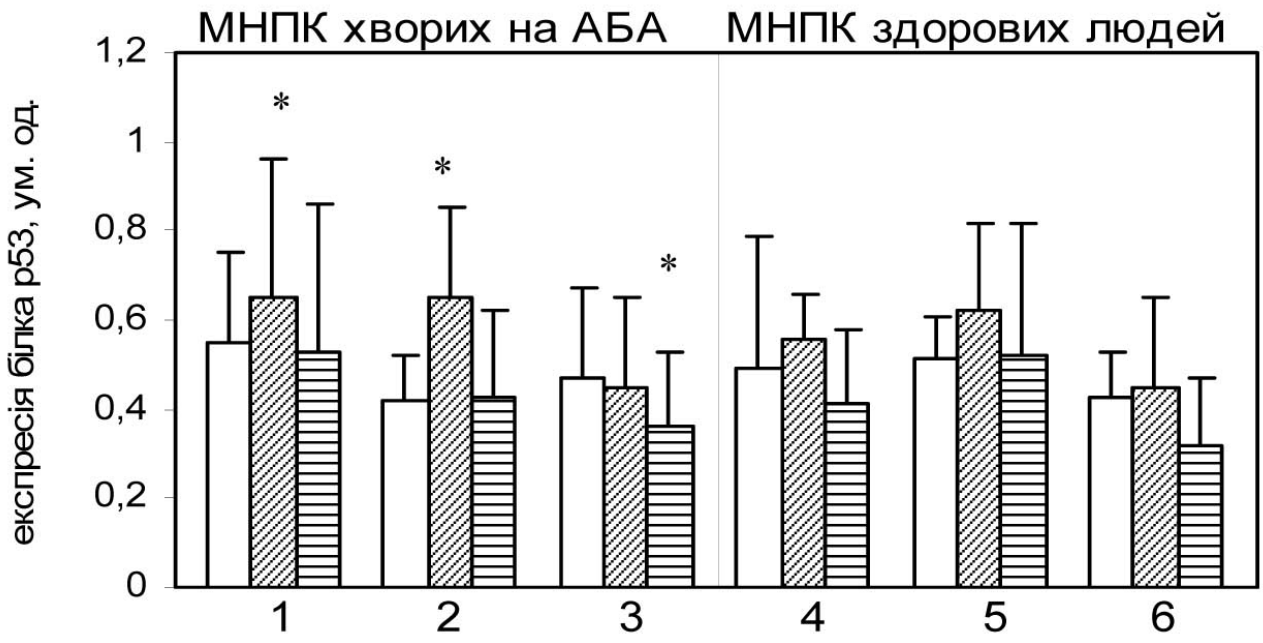

Рис. 3. Експресія проапоптотичного білка p53 (ум. од.) в МНПК хворих на АБА та здорових людей визначена імуноцитохімічним методом. МНПК інкубували у середовищі (стовпчики без штрихів) або у середовищі із додаванням анти-HLA-A, B, C мкАТ (стовпчики з косими штрихами), анти-HLA-DR мкАТ (стовпчики з горизонтальними штрихами) та з паралельним додаванням СЕТ (1, 4), сироватки хворих на АБА (2, 5) та сироватки здорових людей (3, 6).

Показано, що зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення СЕТ до середовища не вплинуло на зміну рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА і здорових людей. Зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення сироватки хворих на АБА до середовища стимулювали підвищення рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА, та навпаки, його пригнічення в МНПК здорових людей. Зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення сироватки здорових людей до середовища призвело до вірогідного пригнічення рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА, та навпаки, до його вірогідно підвищення в МНПК здорових людей.

Встановлено, що зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення СЕТ або аутологічної сироватки призвело до зростання рівня експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА. Разом з тим, не залежно від виду внесеної до середовища сироватки зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ не викликало вірогідних змін у рівні експресії білка p53 в МНПК здорових людей.

Виявлено, що зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення СЕТ або сироватки хворих на АБА призвело до відновлення рівня експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення сироватки здорових людей вірогідно знижувало рівень експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА, проте не викликало змін в МНПК здорових людей.

Відзначено відсутність міжнуклеосомної фрагментації ДНК після зв'язування анти-HLA-A,B,C, анти-HLA-DR мкАТ та внесення СЕТ, сироватки хворих на АБА або сироватки здорових людей до середовища в МНПК хворих на АБА і здорових людей.

На рис. 4 А-Б наведено двохвимірні вірогідні лінійні залежності між значеннями параметрів, що характеризують показники рівня апоптозу, рівні експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 та проапоптотичного білка p53 в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Як видно на рис. 4А, виявлено вірогідний позитивний середньої сили кореляційний зв'язок між рівнями експресії білків Bcl-2 та p53 після зв'язування анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення аутологічної сироватки до середовища в МНПК хворих на АБА ($r=0,576$; $p<0,05$). Встановлено вірогідний негативний середньої сили кореляційний зв'язок між рівнем апоптозу та рівнем експресії білка Bcl-2 після зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення аутологічної сироватки до середовища в МНПК хворих на АБА ($r= - 0,418$; $p<0,05$).

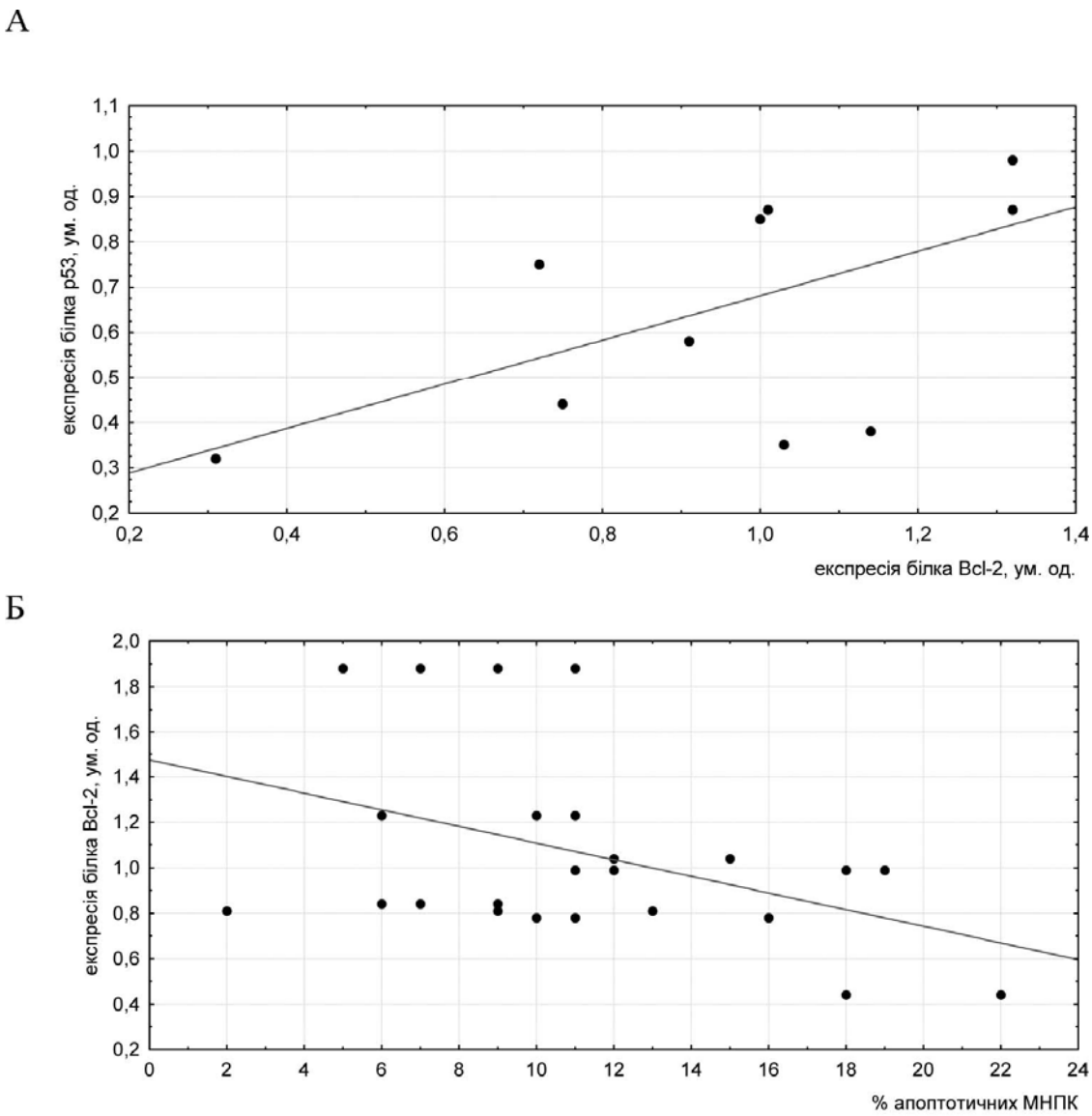

Рис. 4. Лінійна кореляція: А. Між рівнями експресії білків Bcl-2 та p53 в МНПК хворих на АБА, інкубованих у середовищі із додаванням анти-HLA-A,B,C мкАТ та аутологічної сироватки; Б. Між рівнем апоптозу та рівнем експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА, інкубованих у середовищі з додаванням анти-HLA-DR мкАТ та аутологічної сироватки.

Примітка: А. По осі абсцис – ступінь експресії білка Bcl-2 (ум. од.) в МНПК; по осі ординат - ступінь експресії білка p53 (ум. од.) в МНПК; Б. По осі абсцис – рівень апоптозу в МНПК (у %), по осі ординат - ступінь експресії білка Bcl-2 (ум. од.) в МНПК.

Молекули МНС I та II класів відіграють важливу роль у регуляції функціонального стану клітин при фізіологічних і патофізіологічних процесах [12, 13, 14]. Доведено, що активність молекул МНС I та II класів асоційована з формуванням генетичних механізмів схильності до АБА [15]. На сьогоднішній день не виключається, що МНС I- та МНС II-опосередкована трансдукція сигналу апоптозу є ключовою в активації лімфоцитів і регуляції тривалості їх життя при алергічних реакціях. В даній роботі встановлено участь молекул МНС I та II класів в запуску апоптозу та його регуляцію білками Bcl-2 та p53 в МНПК при АБА.

Виявлено чутливість до МНС I-індукованого апоптозу внаслідок зв'язування анти-HLA-ABC мкАТ та внесення СЕТ в МНПК хворих на АБА. Аналогічну чутливість до апоптозу, індукованого зв'язуванням анти-HLA-ABC мкАТ та внесенням аутологічної сироватки виявляють МНПК здорових людей. Отримані нами дані погоджуються з результатами дослідження [12], в якому в лімфоцитах периферичної крові здорових людей встановлений подібний апоптоз-індукуючий ефект анти-HLA-A,B,C мкАТ, який посилювався при додаванні цитокінів, таких як ІЛ-2 та ІФН-γ. Ці дані мають важливе значення оскільки доводять, що апоптоз при АБА не є абсолютно блокованим, а може опосередковуватись через активацію молекул МНС I класу і слугувати потенціальної мішенню для терапевтичного впливу [16].

Виявлено резистентність до МНС I- та МНС II-індукованого апоптозу, індукованого анти-HLA-A,B,C мкАТ або анти-HLA-DR мкАТ при внесенні сироватки хворих на АБА в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Приведені дані свідчать, що резистентність до МНС I- або МНС II-індукованого апоптозу залежить

від впливу факторів сироватки хворих на АБА (цитокіни, розчинні молекули МНС I та II класів), які, ймовірно, підтримують виживання клітин МНПК хворих на АБА та здорових людей. Встановлено пригнічення МНС II-опосередкованого апоптозу після зв'язування анти-HLA-DR мкАТ та внесення аутологічної сироватки в МНПК здорових людей. Отримані результати погоджуються з даними авторів, які вказують на пригнічення МНС II-індукованого апоптозу після зв'язування анти-HLA-DR мкАТ в лімфоцитах та моноцитах здорових людей [7], але механізм даної стійкості залишається досі не розкритим.

У роботі встановлено, що активація молекул МНС I класу анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення сироватки хворих на АБА призводить до вірогідного підвищення рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що стимуляція молекул МНС I класу та вплив сироваткових факторів призводять до активації антиапоптотичного білка Bcl-2, який може викликати резистентність до апоптозу в МНПК хворих на АБА та здорових людей. Аналогічні результати стосовно пригнічення МНС I-опосередкованого апоптозу на фоні високої експресії Bcl-2 отримані у В клітинній лімфомі Loukes та ендотеліальних клітинах [17]. Нами отримані і протилежні дані, які свідчать про стимуляцію МНС I –індукованого апоптозу та впливу факторів СЕТ на фоні зниження рівня експресії білка Bcl-2 в МНПК хворих на АБА. Ці результати вказують на різноспрямований вплив білка Bcl-2 в регуляції сигнальних шляхів МНС I-опосередкованого апоптозу. Відомо, що активація молекул МНС I класу призводить до активації різних кіназ, протеїнкінази С (ПКС) та JNK (Jun-NH_2-kinase або SAPK), кожна з них у свою чергу може фосфорилювати білок Bcl-2. Фосфорилювання білка Bcl-2 за участю ПКС дає йому можливість виконати антиапоптотичну функцію і блокувати розвиток апоптозу, тоді як фосфорилювання білка Bcl-2 кіназою JNK – переводить його в неактивний стан і сприяє розвитку апоптозу [18]. Можна припустити, що і у нашому випадку чутливість клітин до МНС I-опосередкованого апоптозу залежить від обраного клітиною сигнального шляху.

У дослідженні встановлено, що активація молекул МНС I класу анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення аутологічної сироватки викликає вірогідне зростання рівня експресії білка p53, проте не призводить до розвитку апоптозу в МНПК хворих на АБА. Активація молекул МНС I класу анти-HLA-A,B,C мкАТ та внесення СЕТ стимулює розвиток апоптозу на фоні підвищення рівня експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА. Ймовірно, що запуск сигнальних шляхів МНС I-індукованого апоптозу по-різному впливає на активацію проапоптотичного білка p53. Розглядають щонайменше кілька внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналу з молекул МНС I класу, з яких білок p53 може регулювати шлях, ініційований ФЛС-γ_1 і шляхи кіназ МАР, а саме ERK (extrcellular signal regulated kinases) і протеїнкінази JNK [19]. Отже, резистентність до МНС I-індукованого апоптозу формується під впливом аутологічної сироватки та залежить від підвищення експресії білка Bcl-2, який за принципом зворотного зв'язку (кореляційний аналіз) блокує високий рівень експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА.

Показано, що активація молекул МНС II класу анти-HLA-DR мкАТ та внесення аутологічних сироваток стимулюють зростання рівня експресії білка Bcl-2, але не впливають на рівень експресії білка p53 в МНПК хворих на АБА і здорових людей. Отримані дані свідчать, що запуск МНС II-індукованого апоптозу залежить від активації білка Bcl-2, який виступає потужним блокатором даного процесу. На подібну можливість вказує робота авторів [7], які показали, що активація молекул МНС II класу викликає запуск апоптотичного сигналу, який призводить до послідовної транслокації в ядро ПКС, де вона безпосередньо фосфорилює bcl-2 за залишком серину і викликає супресію апоптозу.

Ідентифіковано, що активація молекул МНС II класу анти-HLA-DR мкАТ та внесення сироватки здорових людей викликає пригнічення експресії білка p53 та відсутність змін у рівні апоптозу в МНПК хворих на АБА. З приведених даних випливає, що проапоптотичний білок p53 може бути непрямо залучений у регуляцію МНС II-індукованого апоптозу в МНПК хворих на АБА. Дане положення підтверджується дослідженням [20], в якому методом гібридизації кДНК виявлено резистентні до індукції апоптозу пухлинні клітинні лінії B-CLL, які проявляють високий рівень експресії гена p53 та HLA-DQA1 (молекули МНС II класу). Автори припускають , що ген p53 опосередковано залучений у пригнічення апоптозу, тому стійкість клітин до даного процесу може бути обумовлена "специфічними змінами" даного гену.

Таким чином, у проведеному дослідженні вперше встановлено резистентність до МНС I- та МНС II-опосередкованого апоптозу, що обумовлено впливом сироваткових факторів та станом активності внутрішньоклітинних регуляторних білків - Bcl-2 та p53 в МНПК при АБА. Резистентність до МНС I- та МНС II-опосередкованого апоптозу в МНПК при АБА може бути важливим елементом патогенезу захворювання, оскільки дає можливість клітинам персистувати в органах-мішенях, спричиняючи або підтримуючи алергічне запалення.

Література

1. Akdis C.A., Blaser K., Akdis M. Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease //Curr. Opin. Immunol. – 2004. – Vol. 16. - P. 717-723.
2. Мамонтова Т.В., Кайдашев И.П. Новые аспекты апоптоза мононуклеарных клеток в патогенезе атопической бронхиальной астмы //Аллергология. – 2005. - № 4. – С. 15-23.
3. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma /Meiler F., Zimmerman M., Akdis C.A., Akdis M. //Curr. Allergy Asthma Rep. – 2006. – Vol. 6(2). – P. 91-96.
4. Мамонтова Т.В., Кайдашев І.П. Спонтанний апоптоз та експресія білків Bcl-2 і p53 мононуклеарних клітин периферійної крові у хворих на атопічну бронхіальну астму //Імунологія та алергологія. – 2005. – № 3. – С. 43-46.
5. Jindra P.T., Reed E.F. Signal transduction through major histocompatibility complex molecules //Cur. Opin. Organ Transpl. – 2007. – Vol. 12(4). – P. 426-431.
6. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) contributes to melanoma resistance to apoptosis /Hemon P., Jean-Louis F., Ramgolam K. et al. //J. Immunol. – 2011. – Vol. 186(9). – P. 5173-5183.
7. Yang J., Yi Q. Killing tumor cells through their surface beta(2)-microglobulin or major histocompatibility complex class I molecules //Cancer. – 2010. – Vol. 116(7). – P. 1638-45.
8. The TCR-binding region of the HLA class I domain signals rapid Fas-independent cell death: A direct pathway for T cell-mediated killing of target cells? /Pettersen R.D.,

Gaudernack G., Olafsen M.K., Lie S.O., Hestdal K. //J. Immunology. — 1998. – Vol. 160. – P. 4343-4352.
9. A caspase-idependent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes /Drenou B., Blancheteau V., Burgess D.H., Fauchet R. et al. //J. Immunol. – 1999. – Vol. 163(8). – P. 4115-4124.
10. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. і др.; Під ред. Кайдашева І.П. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
11. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death /Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E. et al. //Cell Death Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 1463–1467.
12. Induction of apoptosis in human lymphocytes by human anti-HLA class I antibodies /Daniel D., Opelz G., Mulder A., Susal C. //Transplantation. - 2003. – Vol. 75(8). – P. 1380-1386.
13. MHC class II signaling function is regulated during maturation of plasmacytoid dendritic cells /Drenou B., Amiot L., Setterblad N. et al. //J. Leukoc. Biol. – 2005. – Vol. 77(4). – P. 560-567.
14. Anti beta2-microglobulin monoclonal antibodies induce apoptosis in myeloma cells by recruiting MHC class I to and excluding growth and survival cytokine receptors from lipid rafts /Yang J., Zhang X., Wang J. et al. //Blood. – 2007. – Vol. 110(8). – P. 3028-3035.
15. Иллек Я.Ю., Зайцева Г.А., Муратова Н.Г. Ассоциативная связь атопической бронхиальной астмы у детей с антигенами главного комплекса гистосовместимости //Аллергология и иммунология. – 2007. – Т. 8. – № 1. – С. 36-37.
16. Мамонтова Т.В., Кайдашев І. П., Куценко Н.Л., Кривонос Т.В. Спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові. Деклараційний патент на винахід № 60629А; Заявл. 16.01.2003; Опубл. 15.10.2003; Бюл. № 10. С. 2.
17. Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells /Jin Y.P., Fishbein M.C., Said J.W., Jindra P.T. et al. //Hum. Immunol. – 2004. – Vol. 65(4). – P. 291-302.
18. A functional role for mitochondrial protein kinase C alpha in Bcl-2 phosphorylation and suppression apoptosis /Ruvolo P.P., Deng X., Carr B.K., May W.S. //J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. - P. 25436-25442.
19. Lamberth K., Claesson M.H. Ligation of major histocompatibility complex class I antigens (MHC-I) prevents apoptosis induced by Fas or SAPK/JNK activation in T-lymphoma cells //Tissue Antigens. – 2001. – Vol. 58(3). – P. 171-180.
20. The resistance of B-CLL cells to DNA damage–induced apoptosis defined by DNA microarrays /Vallat L., Magdelénat H., Merle-Béral H., Masdehors P. et al. //Blood. – 2003. - Vol. 101(11). – P. 4598-4606.

Summary

ROLE OF BCL-2 AND P53 PROTEINS IN THE REGULATION OF APOPTOSIS, INDUCED BY MOLECULES MHC I AND II LIGATION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Mamontova T.V.

Key works: apoptosis, peripheral blood mononuclear cells, atopic bronchial asthma

Apoptosis plays an key role in the pathogenesis of atopic bronchial asthma (ABA). The major histocompatibility complex (MHC) class I and II molecules mediates apoptosis of lymphocytes. The main purpose of this study is to investigate the influence of MHC class I and II molecules ligation by monoclonal antibodies (mAbs) on apoptosis, expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and proapoptotic protein p53 in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with ABA. It has been shown that PBMCs from patients with ABA and in healthy donors (HD) demonstrate resistance to apoptosis, high expression of Bcl-2 and/or p53 after HLA-ABC mAbs ligation in the presence of serum from ABA. Ligation anti-HLA-DR mAbs induced the resistance to apoptosis and the increase of Bcl-2 protein expression in PBMCs in ABA and HD in the presence of autologic sera. The study has showed that resistance to MHC I- and MHC II-induced apoptosis, related to high expression of protein Bcl-2 and regulatory action of autologic serum factor('s) in PBMCs from patient with ABA. Thus, such resistance to MHC I- and MHC II-mediated apoptosis may represent a key mechanism of pathogenesis of ABA, since it allows the cells to persist in target organs, activating or sustaining the airway inflammation.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics
Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

Матеріал надійшов до редакції 8.12.2011 р.