

© Булгакова В.А., 2008

В.А. Булгакова

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗУЧЕНИЯ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

ГУ Научный центр здоровья детей РАМН (директор — акад. РАМН А.А. Баранов), Москва

Статья посвящена исследованию маркеров активации и апоптоза иммунных клеток при атопической бронхиальной астме (АБА). Изучено содержание растворимых мембранных рецепторов активации, также модулирующих процессы апоптоза — sCD30, sCD40, sCD95 (sAPO-1/FAS), растворимого лиганда FAS (sFASL), лиганда TRAIL (APO-2L), ранних свидетелей эффекторной стадии апоптоза фермента Caspase-1/ICE и белка Annexin V. Установлены достоверные отличия концентрации указанных показателей от их референтных уровней, наиболее выраженные при тяжелом течении болезни, а также при наличии сопутствующей вирусной и бактериальной инфекции, свидетельствующие об изменениях процесса как FAS-, так и TRAIL-индуцированного апоптоза провоспалительных и иммунокомпетентных клеток при АБА.

Author studied markers of activation and apoptosis in cases of atopic bronchial asthma (ABA). Next parameters were examined: soluble membrane receptors of activation, factor modulating apoptosis including sCD30, sCD40, sCD95 (sAPO-1/FAS), soluble FAS ligand (sFASL), TRAIL ligand (APO-2L); early witnesses of caspase-1/ICE and Annexin V early apoptosis. The study showed significant differences of these factors concentration in patients with ABA and normal levels. Difference was maximal in cases of severe BA and in cases of concomitant viral and bacterial infections. These changes testified to changes in both FAS-induced and in TRAIL-induced apoptosis of pro-inflammatory and immune cells in cases of ABA.

Апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, является звеном многих биологических процессов у многоклеточных организмов, в частности, оптимизируя функции иммунной и нервной систем [1]. В отличие от пассивного патологического процесса — некротической гибели клетки, апоптоз — активная реакция. Апоптоз — высокорегулируемый и сложный процесс, активность многих генов и сигнальных путей влияет на решение клетки включить программу самоликвидации. Апоптоз играет важную роль в обеспечении гомеостаза тканей, осуществляя защитную функцию, элиминируя аутореактивные Т-лимфоциты-киллеры, ограничивая тем самым деструкцию собственных клеток и тканей организма. Процесс апоптоза структурно разделяют на три независимые фазы: инициация, эффекторная фаза и деградация [2–5]. Фаза инициации может быть достигнута различными путями: удалением факторов роста и метаболизма, гипоксией, гипероксией, физическими агентами, перекрестным связыванием соответствующих рецепторов, нарушением сигналов клеточного цикла и др. В течение эффекторной фазы различные иницирующие пути конвертируются в один общий путь апоп-

тоза, фаза деградации — также общая для всех иницирующих путей [4]. В большинстве случаев апоптоз характеризуется сморщиванием клетки, перестройкой мембранных структур (появление на поверхности клеточной мембраны фосфатидилсерина), уменьшением объема клетки, конденсацией ядра, разрывами нитей ядерной ДНК с последующим распадом ядра на части. Во время завершающей стадии небольшие остатки клеток в форме мембранных везикул с внутриклеточным содержимым («апоптозные тельца») захватываются фагоцитами, что предотвращает развитие воспалительной реакции [6].

В последнее время большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на различные патологические процессы. Экспериментальное обоснование получает предположение о том, что в основе многих лимфопролиферативных и аутоиммунных заболеваний существенное значение принадлежит процессу нарушения клеточного апоптоза по типу блока негативной активации, в результате чего возникает неудержимая клеточная пролиферация, в том числе и «запрещенных» клонов лимфоцитов [7]. Показано, что одним из патогенетических аспектов опухолевой

трансформации, аутоиммунных и атопических заболеваний является ингибирование апоптоза [3–5, 8–11]. Напротив, неадекватное усиление его наблюдается при нейродегенеративных, диспластических процессах и ишемических повреждениях различных органов [3, 4]. Нарушение реализации апоптоза является также основой формирования хронических инфекционных процессов, в том числе и вирусной природы [12].

Атопическая бронхиальная астма (АБА) рассматривается как хроническое аллергическое воспаление бронхов, обусловленное стимуляцией различными аллергенами антигенпрезентирующих и иммунокомпетентных клеток, активацией клона Т-лимфоцитов-хелперов 2-го типа (Th2), с последующей активацией цитокинов и продукцией плазматическими клетками специфических антител класса IgE [13, 14]. Многочисленными исследованиями показано, что центральную роль в регуляции Th1/Th2-клеточного баланса играет цитокиновый профиль [15–19]. Однако в направленности поляризации Th1- и Th2-лимфоцитов существенное значение принадлежит процессу апоптоза [2, 6, 20, 21]. В развитии аллергического воспаления в слизистой оболочке бронхов при бронхиальной астме (БА) и последующее его персистирование, характеризующее тяжесть течения БА, определяющую роль играет не только функциональная активность, но и нарушение элиминации клеток, участвующих в воспалении [14, 22–24]. Известно, что для любого воспалительного процесса характерно повреждение тканей, гибель клеток при этом происходит преимущественно по механизму некроза. Однако на завершающих этапах воспаления апоптозу принадлежит важная роль, поскольку в этот период происходит устранение активированных клеток иммунной системы, выполнивших свои функции. То же относится к аллергическому воспалению, при котором упомянутая элиминация эффекторных клеток затруднена также в связи с их способностью к самоподдержанию благодаря выработке аутокринных цитокинов (например, активированные эозинофилы секретируют GM-CSF, который защищает их от апоптоза) [3, 8].

В литературе нет данных, характеризующих процесс апоптоза иммунокомпетентных клеток во всех его фазах при АБА у детей. Среди маркеров апоптоза наиболее изученным является клеточный рецептор CD95 (FAS), по которому судят об активации иммунных клеток и их готовности к FAS-индуцированному апоптозу, в том числе при аллергической патологии [4, 25, 26]. Однако в процессе апоптоза решающая роль принадлежит также системе лигандов, основных индукторов сигнала к запуску апоптоза, а также системе каспаз, отвечающих за эффекторное звено апоптоза. Кроме того, помимо FAS-опосредованного апоптоза существуют другие пути передачи сигнала клетке через систему рецептор–лиганд [5, 6, 27, 28].

Также наряду с мембранными молекулами активации и апоптоза в иммунных реакциях принимают участие и их растворимые формы (s-формы рецепторов и лигандов), образующиеся за счет протеолитического сщивания (расщепления) их внеклеточной части с поверхности клетки или альтернативного сплайсинга матричной РНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта [29]. Показано, что s-формы поверхностных мембранных молекул иммунокомпетентных клеток обладают иммунорегуляторными свойствами, а их уровни отражают процессы активации и элиминации клеток иммунной системы и могут служить маркерами течения патологического процесса. В настоящее время растворимые мембранные молекулы клеток иммунной системы, особенно маркеры активации и апоптоза, исследуются при аутоиммунных, инфекционных, онкологических заболеваниях [30, 31]. Обнаружены изменения сывороточного содержания некоторых растворимых мембранных молекул при БА и аллергическом рините [32, 33]. Однако роль участия растворимых форм мембранных молекул активации и апоптоза клеток иммунной системы в патогенетическом механизме атопических болезней у детей, в том числе при АБА, мало изучена.

Все вышеизложенное и определило цель настоящей работы — изучение клинического значения сывороточных маркеров апоптоза иммунокомпетентных клеток у детей с АБА.

Материалы и методы исследования

Обследованы 96 детей в возрасте от 5 до 16 лет: 15 детей практически здоровых (без признаков аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных заболеваний), проходивших диспансеризацию, и 81 пациентов с подтвержденным диагнозом АБА, госпитализированных в аллергологическое отделение НИЦЗД РАМН. У 31 пациента диагностирована легкая персистирующая, у 35 — персистирующая средней тяжести и у 15 — тяжелая персистирующая БА.

Исследование содержания в сыворотке крови растворимых мембранных маркеров апоптоза — sCD95 (sAPO-1/FAS), растворимого FAS лиганда (sFASL), индуцирующего апоптоз TNF-зависимого лиганда для рецепторов DR4 и DR5 TRAIL, свидетелей ранней стадии эффекторного этапа апоптоза — фермента, преобразующего IL1 β , Caspase-1/ICE (ICE — IL1 β Converting Enzyme) и последующей его стадии белка Annexin V, а также sCD30 и sCD40 — маркеров активации, модулирующих также процессы апоптоза, осуществляли посредством иммуноферментного энзим-связанного иммуносорбентного анализа (enzym-linked immunosorbent assay — ELISA) с использованием коммерческих наборов "Human sAPO-1/FAS ELISA", "Human sFAS Ligand ELISA", "Human TRAIL ELISA", "Human Caspase-1/ICE ELISA", "Human Annexin V ELISA", "Human sCD30

ELISA", "Human sCD40 ELISA" (Bender MedSystems GmbH, Austria) согласно рекомендациям производителя на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Coda» (Bio-Rad Laboratories, USA).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы Statistica (StatSoft, версия 6,0) с расчетом средней арифметической величины M и ошибки репрезентативности средней величины m ($M \pm m$), для выяснения статистической зависимости между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции r , различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ключевыми молекулами апоптоза являются рецепторы смерти, которые передают внутрь клетки сигналы, поступающие в виде лигандов смерти [5]. Рецепторы смерти принадлежат суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей (TNFRSF — Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily). Отличительной чертой членов этого суперсемейства является наличие внеклеточного домена, содержащего повторы, богатые цистеином, формирующим поверхность, ответственную за взаимодействие с лигандом. Наиболее изученными рецепторами смерти являются CD95 (он же APO-1 и FAS) и рецептор фактора некроза опухолей 1 (TNFR1, он же p55). К рецепторам смерти относятся также рецептор смерти 3 (DR3, он же APO-3), рецептор смерти 5 (DR5, он же APO-2), рецепторы смерти 4 и 6 (DR4 и 6). Лиганды рецепторов смерти сходны между собой по структуре и также принадлежат суперсемейству фактора некроза опухолей. Лигандом для FAS является FASL (APO-1L, он же CD178), лигандами для TNFR1 — фактор некроза опухолей и лимфотоксин α , для рецепторов смерти 4 и 5 — TRAIL (APO-2L), для рецептора смерти 3 — TWEAK (APO-3L). Известно, что рецептор CD95, выступающий как поздний

активационный маркер, представлен преимущественно на Т-лимфоцитах-хелперах, тогда как CD178 — на Т-клетках-киллерах [34, 35]. Взаимодействие рецептора FASL (CD178) с FAS-рецептором (CD95) является важнейшим механизмом активационной элиминации лимфоцитов, выполнивших свою функцию. Предполагается, что растворимый sCD95, продукт альтернативного сплайсинга матричной РНК, выступает в качестве ингибитора связывания FAS с FAS-лигандом и блокирует FAS-опосредованный апоптоз, взаимодействуя с FAS-лигандом на поверхности клетки [36]. Растворимая форма FASL (или sCD178), циркулируя в крови, может провоцировать клетки, имеющие на своей поверхности FAS-рецепторы, к апоптозу.

В отличие от FASL, экспрессированного главным образом на активированных Т- и NK-клетках и клетках иммунопривилегированных зон, индуцирующий апоптоз TNF-зависимый лиганд для рецепторов DR4 и DR5 TRAIL (APO-2L) был обнаружен во многих тканях организма. Однако, как и в случае с FASL, экспрессия TRAIL повышается в Т-лимфоцитах в ответ на антигенную стимуляцию [27, 28]. Зрелые Т-лимфоциты приобретают чувствительность к APO-2L-индуцированному апоптозу после воздействия IL2, что говорит о возможной роли APO-2L в контроле иммунных реакций. Кроме того, показано возрастание чувствительности клеток к APO-2L у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что предполагает роль TRAIL-опосредованного апоптоза в уничтожении инфицированных вирусом клеток [27].

В табл. 1 и 2 представлены средние уровни концентрации сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток крови здоровых детей и детей с БА, сравнение которых выявило статистически достоверные отличия. У обследованных пациентов с БА среднее содержание sCD95 было выше, а sFASL — несколько ниже, чем в

Таблица 1

Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у обследованных детей

Группы обследованных детей	sCD95, pg/ml	sFASL (sCD178), pg/ml	TRAIL, pg/ml	sCD30, U/ml	sCD40, pg/ml	Caspase-1/ICE, pg/ml	Annexin V, ng/ml
АБА (n=81)	579,79±25,17*	0,15±0,03	441,82±29,23*	61,0±5,3*	24,54±3,41*	44,19±5,3	4,1±0,93*
Длительность БА менее 2 лет (n=19)	481,17±21,36	0,14±0,06	452,37±29,23	59,96±4,46	25,64±3,42	48,16±5,15	4,08±0,41
Длительность БА более 2 лет (n=62)	668,89±28,12**	0,16±0,09	429,44±29,23**	62,04±6,88#	23,41±3,43	39,21±5,1**	4,1±0,51
Здоровые дети (n=15)	400,5±4,9	0,21±0,01	706,4±7,4	34,4±0,3	35,3±0,4	53,7±0,5	21,3±0,2

* $p < 0,001$ в сравнении со здоровыми детьми; ** $p < 0,05$ в сравнении с длительностью БА менее 2 лет.

группе сравнения (соответственно $579,79 \pm 25,17$ и $400,5 \pm 4,9$ pg/ml, $0,15 \pm 0,03$ и $0,21 \pm 0,01$ pg/ml), также наблюдалась сопряженность уровня sCD95 с тяжестью, периодом и длительностью течения болезни. Средняя концентрация TRAIL у детей с БА была ниже, чем в группе сравнения ($441,82 \pm 29,23$ и $706,4 \pm 7,4$ pg/ml), отмечалась сопряженность его уровня с обострением, длительностью и утяжелением БА.

При апоптозе, в отличие от физиологического ответа клетки, действуют свои, характерные только для апоптоза, специализированные необратимые реакции протеолиза, катализируемые специфическими протеазами, относящимися к классу цистеиновых протеаз. Эта группа протеаз, названная каспазы (Caspase — Cysteinyl Aspartat specific proteinase), существует обособленно и функционирует как медиатор сигнала смерти [5]. Каспазы расщепляют белки в местах расположения аспарагиновых соединений. Активация каспаз является эффекторным этапом апоптоза. Каспазы существуют как инертные проферменты, активирующиеся самостоятельно. К настоящему времени у человека идентифицировано 14 разновидностей каспаз, образующих ферментативный каскад, подобно ферментативному каскаду свертывающей системы крови или системы комплемента [5, 7]. Каспазы могут быть объединены в несколько групп по их специфичности к субстрату и функциям. Первую группу представляют инициаторные ферменты (каспазы 8, 9, 10), необходимые для начала и распространения сигнала клеточной гибели. Во вторую объединяют эффекторные каспазы 2, 3, 6, 7, которые вовлекаются в стремительный процесс расщепления структурных компонентов и элементов жизнеобеспечения клетки (например, PARP — поли-АДФ-рибоза-полимераза), участвующих в регуляции межгенных взаимодействий, восстановлении ДНК и ядерной мембраны, также к этой группе относится и ряд ферментов, участвующих в ДНК-фрагментации. Третья категория каспаз (1, 4, 5 и 13), именуемые ICE-подобные или активаторы цитокинов, могут быть вовлечены в равной степени в процессы апоптоза и воспаления. Фермент, преобразующий IL1 β (Caspase-1/ICE) в его естественную форму IL1 в моноците, стал первым членом семейства каспаз. Оказалось, что он отвечает за многие протеолитические процессы в ранней стадии эффекторного этапа апоптоза и при воспалении. Средняя концентрация Caspase-1/ICE у детей с БА была ниже, чем в группе сравнения (соответственно $44,19 \pm 5,3$ и $53,7 \pm 0,5$ pg/ml), более выраженные изменения выявлялись при обострении БА, более длительном и тяжелом течении болезни. Учитывая в целом неспецифическую регулируемую роль протеаз в поддержании физиологического равновесия, в том числе иммунного баланса, выявленный дефицит сывороточного уровня Caspase-1/ICE, участвующего в эффектор-

ном этапе апоптоза, может свидетельствовать о ферментной дисфункции у пациентов с АБА и связанным с ней нарушением элиминации отслуживших иммунных клеток, что в свою очередь способствует утяжелению и хронизации аллергического воспалительного процесса.

Биохимические изменения при апоптозе включают транслокацию мембранного фосфолипида внутренней стороны цитоплазматической мембраны фосфатидилсерина на ее внешнюю сторону [6]. Локализация фосфатидилсерина на поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней (еще обратимой) стадии апоптоза до полной дегградации клетки. Свидетелем эффекторной стадии элиминации активированных клеток выступает антикоагулянт Annexin V. Связываясь с фосфатидилсерином на поверхности клетки, Annexin V, конъюгированный с флуорохромом, служит маркером апоптоза [37]. Annexin V — представитель семейства кальций-зависимых фосфолипидсвязывающих протеинов, имеющий высокую аффинность к фосфатидилсерину, связывается с клетками, экспрессирующими этот фосфолипид, и ингибирует прокоагулянтную и провоспалительную активности гибнущих клеток. Средняя концентрация Annexin V у детей с БА была ниже, чем в группе сравнения (соответственно $4,1 \pm 0,93$ и $21,3 \pm 0,2$ ng/ml), значительное отличие отмечалось при обострении и тяжелом течении БА.

Представление мембранного белка CD30 связано с дифференцировочным и активационным этапом Т-клеток человека, продуцирующих цитокины, характерные для Th2-клеток [22, 38]. Взаимодействия цитокинового рецептора CD30 со своим лигандом имеет плейотропные биологические эффекты, такие как дифференцировка, активация, пролиферация и клеточная гибель. В CD30+ клеточных линиях связывание лиганда CD30 (CD30L) индуцирует гибель клеток в процессе апоптоза. Более того, CD30 вполне может быть вовлечен в контроль сигнала CD40/CD40L, пролиферацию Т-клеток и созревание В-клеток, индуцированное Т-клеточными цитокинами. Таким образом, CD30 передает информацию, необходимую для иммунного ответа. Экспрессия CD30 строго зависит от активации и пролиферации Т- и В-клеток. Сывороточное содержание s-формы CD30 (sCD30), образующейся за счет протеолитического расщепления своей мембранной предшественницы, служит маркером присутствия CD30+ клеток. Средний уровень растворимой молекулы sCD30 у детей с БА был достоверно выше референтного уровня (соответственно $61,0 \pm 5,3$ и $34,4 \pm 0,3$ U/ml), также наблюдалась сопряженность уровня исследуемого показателя с длительностью, тяжестью течения и рецидивом болезни.

Мембранный белок CD40 играет важную роль в выживаемости, росте и дифференцировке В-клеток. Передача сигнала через CD40 обуславливает

основные события Т–В взаимодействия: переключение классов иммуноглобулинов, индукцию пролиферации и дифференцировки при гуморальном иммунном ответе [22, 38]. Лиганд CD40 (CD154), также как и другие лиганды, принадлежит к TNFRSF и проявляет свойства ко-стимулятора пролиферации Т-клеток и экспрессируется активированными лимфоцитами. Показано, что процесс апоптоза вовлечен в элиминирование клонов аутореактивных лимфоцитов при нормальном функционировании иммунной системы [2, 6]. Опосредованный В-клеточный апоптоз блокируется при передаче сигнала через молекулу CD40 на поверхности В-клетки [22]. Так как CD40L экспрессируется активированными Т-хелперными клетками, В-клетки могут удаляться путем апоптоза и активироваться при взаимодействии иммунной системы с внешним антигеном. Таким образом, взаимодействие CD40–CD40L играет центральную роль в различных фазах В-клеточного ответа на Т-зависимые антигены. Высвобождение В-лимфоцитами растворимой CD40 предполагает ингибицию синтеза матричной РНК лиганда — CD154 [22]. Средняя концентрация sCD40 у детей с БА была ниже, чем в группе сравнения (соответственно $24,54 \pm 3,41$ и $35,3 \pm 0,4$ pg/ml), значительно отличаясь при тяжелом течении БА.

Одной из причин отсутствия контроля над симптомами БА является рецидивирующая инфекция. В предыдущих исследованиях было показано воздействие вирусных и бактериальных инфекций на иммунологическую реактивность детей с аллергической патологией [39, 40]. В данной работе также были выявлены стойкие изменения концентрации исследуемых показателей у детей с АБА и рецидивирующей респираторной инфекцией, наиболее выраженные отличия отмечены в содержании sCD95, sCD30, TRAIL, Caspase-1/ICE (табл. 2).

Развитие инфекционного воспаления связано с процессами торможения апоптоза [34, 38]. Существуют данные о способности некоторых вирусов и микроорганизмов вырабатывать вещества, похожие на естественные ингибиторы процесса клеточной гибели. Так, одним из механизмов персистенции герпесвируса 4-го типа — Эпштейн–Барр вируса в В-лимфоцитах является стимуляция протоонкогенов типа bcl-2; аденовирус сам синтезирует белок, похожий на bcl-2; вирус папилломы человека вырабатывает протеин, блокирующий проапоптотический белок p53; хламидии влияют на поступление в цитозоль митохондриального цитохрома C; *Toxoplasma gondii*, проникая в клетку, делает ее устойчивой к различным медиаторам апоптоза [41, 42]. Кодированный несколькими герпесвирусами белок, уменьшая распад прокаспазы-8 на активные субъединицы, способен предотвращать FAS-индуцированный апоптоз, не допуская таким образом активацию последующих сигнальных путей [43]. Возможно, именно с механизмом апоптоза связана выявленная нами ранее длительная и массивная персистенция различных респираторных вирусов у детей с АБА и атопическим дерматитом [39]. Предполагается, что повышенный уровень s-формы мембранной молекулы CD95, ингибирующей, как было отмечено выше, апоптоз, является одной из причин слабого иммунного ответа на вирусную инфекцию и, как следствие, ее длительной персистенции в организме [31]. Показана возможность связывания sCD95 с FAS-лигандом не только на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) и NK-клеток, но и на Т-лимфоцитах-хелперах 1-го типа [44]. Возникающий литический эффект инфицированной вирусом клетки достигается преимущественно за счет цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), а также CD4+ (Th1-система). Наблюдаемый в данном исследовании высокий уровень растворимой мембранной молекулы CD95,

Таблица 2

Динамика содержания сывороточных маркеров активации и апоптоза у детей с АБА

Группы обследованных детей	sCD95, pg/ml	sFASL (sCD178), pg/ml	TRAIL, pg/ml	sCD30, U/ml	sCD40, pg/ml	Caspase-1/ICE, pg/ml	Annexin V, ng/ml
Легкое течение БА (n=31)	490,49±32,87*	0,18±0,05	498,92±31,35*	45,7±4,6*	28,76±3,14	47,01±5,52	5,15±0,99*
Среднетяжелое течение БА, период ремиссии (n=20)	593,7±31,2*#	0,15±0,01*#	484,62±22,61*	56,2±6,1*#	24,94±3,24*	45,5±5,11*	4,0±0,89*
Среднетяжелое течение БА, период обострения (n=15)	637,64±38,4*#	0,13±0,01*#	434,78±27,43*	60,1±6,3*#	25,54±3,52*	41,99±5,38*	3,05±0,73*
Тяжелое течение БА (n=15)	598,99±34,32*#	0,14±0,09*#	401,81±28,2#	76,2±5,1*#	19,35±2,96*#	42,17±5,33*#	4,11±0,86*
БА с рецидивирующей респираторной инфекцией (n=49)	592,86±42,31*	0,16±0,01	451,62±29,93*	62,9±5,1*	30,02±4,32	41,12±4,93*	4,9±0,97*
Здоровые дети (n=15)	400,5±4,9	0,21±0,01	706,4±7,4	34,4±0,3	35,3±0,4	53,7±0,5	21,3±0,2

* p<0,001 — в сравнении со здоровыми детьми; # p<0,05 — в сравнении с легким течением БА.

способной блокировать Th1-клетки, опосредующие свое действие в результате интенсификации процессов апоптоза, также может способствовать дисбалансу Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов при атопии. Кроме того, может служить одним из механизмов недостаточной иммунорегуляции цитотоксичности, которой отводится ведущая роль в элиминации инфекционного возбудителя, что в свою очередь объясняет склонность пациентов с АБА к инфицированию и персистенции возбудителей как банальных вирусных, так и оппортунистических инфекций.

В патогенезе аллергических болезней, в том числе АБА, важное место занимает вторичная иммуносупрессия, в развитии которой предполагается нарушение апоптотических процессов, в частности связанная с эффектом негативной активации [2, 23, 24]. Выявленные изменения в со-

держании sCD30 и sCD95 у обследованных детей могут отражать стойкую активацию Th2-лимфоцитов и свидетельствовать о супрессии Th1-ответа, характерных при атопии. Указанные изменения являются также предрасполагающим фактором, способствующим инфицированию, и наиболее выражены при длительном и тяжелом течении БА.

Проведенный анализ корреляционных взаимоотношений между средним содержанием изученных показателей выявил прямую зависимость между уровнями sCD95 и sCD30 ($r=0,34$; $p<0,05$), sFAS и Caspase-1/ICE ($r=0,28$; $p<0,05$), sFAS и Annexin V ($r=0,29$; $p<0,05$), обратная корреляционная зависимость была выявлена между содержанием sCD95 и sFASL ($r=-0,31$; $p<0,05$), sCD30 и sCD40 ($r=-0,30$; $p<0,05$), sCD95 и Caspase-1/ICE ($r=-0,34$; $p<0,05$), sCD95 и Annexin V ($r=-0,36$; $p<0,05$), что характеризует патогенетические взаимосвязи этих показателей в процессе развития аллергического воспаления и свидетельствует о нарушении соотношения между активацией и элиминацией иммунокомпетентных и провоспалительных клеток при АБА у детей. Также в результате анализа полученных результатов была выявлена взаимосвязь изученных показателей от формы течения БА у обследованных детей (табл. 2, рисунок).

Таким образом, результаты исследования выявили достоверные изменения содержания сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток у детей с АБА. Установлены достоверные отличия концентрации указанных показателей от их референтных уровней, наиболее выраженные при тяжелом течении болезни, в стадии обострения, а также при наличии сопутствующей инфекции, свидетельствующие об изменениях процесса как FAS-, так и TRAIL-индуцированного апоптоза провоспалительных и иммунокомпетентных клеток при АБА. Между исследованными показателями установлены множественные корреляционные взаимосвязи, что указывает на взаимообусловленность процессов рецепции (активации) и элиминации (апоптоза) в патогенезе БА у детей. Выявленная устойчивость иммунокомпетентных клеток к апоптозу как в фазе инициации, так и в эффекторной фазе может иметь патогенетическое значение в персистенции аллергического воспаления, что согласуется с данными других исследователей [23, 24]. Склонность к частой заболеваемости респираторными инфекциями детей с АБА объясняет развитие вторичной иммуносупрессии, в формировании которой существенное значение может принадлежать нарушениям процессов апоптоза иммунных клеток, выявленным у обследованных детей.

Оценка уровня сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток может быть использована в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия тяжести и выраженности АБА у детей, служить методом иммуномониторинга и прогностическим критерием отбора пациентов

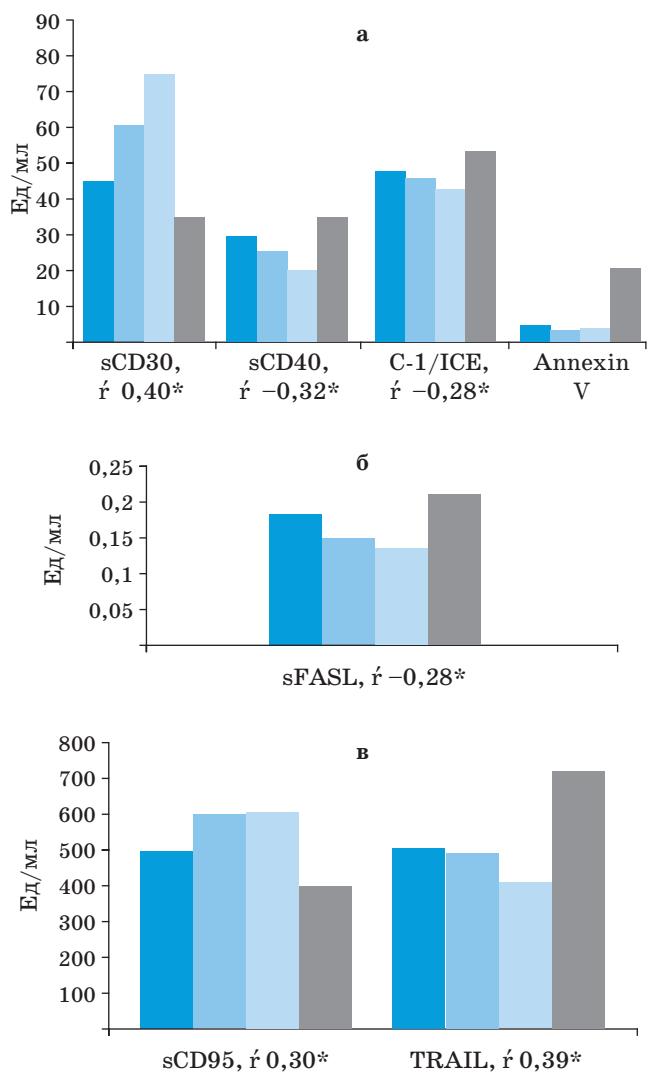


Рисунок. Взаимосвязь формы течения атопической бронхиальной астмы и уровня сывороточных маркеров активации и апоптоза (а, б, в) у обследованных детей.

* $p<0,05$; ■ дети с легкой БА, ■ дети со среднетяжелой БА, ■ дети с тяжелой БА, ■ здоровые дети.

для проведения иммунотерапии, а также дополнительным обоснованием своевременного и адекватного

назначения противовоспалительной терапии с целью достижения контроля над симптомами БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 770–776.
2. Сениашивили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В. и др. Апоптоз в иммунологических процессах. *Аллергология и иммунология*. 2000; 1 (1): 15–23.
3. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А. и др. Апоптоз, роль в патологии, значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных. *Мед. иммунология*. 2000; 2: 7–16.
4. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002.
5. Блохин Д.Ю. Программированная гибель клеток: путь от индукции до исполнения. *Патогенез*. 2003; 2: 25–33.
6. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003: 443–498.
7. Маркеры апоптоза. <http://www.boichemmack.ru>
8. Смирнов И.Е., Паунова С.С. Апоптоз и патологический процесс. <http://www.nczd.ru/art7.htm>
9. Fahy JE, Qian SF, Bloom JW, Halonen MJ. Fas receptor expression on asthmatic eosinophils. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1998; 102 (1): 93–96.
10. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103 (4): 563–573.
11. Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Fas-рецептор и его роль при atopических заболеваниях. *Иммунология*. 2001; 3: 24–29.
12. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. of General Virology*. 2002; 83: 1547–1564.
13. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей. М.: Медицина, 2003.
14. Балаболкин И.И., Смирнов И.Е., Булгакова В.А. и др. Современная концепция патогенеза бронхиальной астмы у детей. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2006; 1: 26–35.
15. Jenmalm MC, Van Snick J, Cormont F et al. Allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion in relation to specific allergen sensitization and atopical symptoms in children. *Clinical & Experimental Allergy*. 2001; 31 (10): 1528–1535.
16. Kuo ML et al. Evaluation of Th1/Th2 ratio cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86 (3): 272–276.
17. Намазова Л.С., Ревакина В.А., Балаболкин И.И. Роль цитокинов в формировании аллергических реакций у детей. *Педиатрия*. 2000; 1: 56–67.
18. Зайцева О.В., Лаврентьев А.В., Самсыгина Г.А. Роль некоторых цитокинов при бронхиальной астме у детей. *Педиатрия*. 2001; 1: 13–19.
19. Ботвиньева В.В., Филянская Е.Г., Рыльева И.В., Джгаркава И.З. Участие клеточных механизмов и цитокинов в течении бронхиальной астмы у детей. Материалы 1-го Всероссийского конгресса по детской аллергологии. М., 2001: 22.
20. Van Parijs L, Biuckians A, Abbas AK. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 160: 2065–2071.
21. Vandenberg A, Barnes D, Finn T et al. Differential susceptibility of human Th1 versus Th2 cells to induction of anergy and apoptosis by ECDI/antigen-coupled antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 2000; 12 (1): 57–66.
22. Гуштин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М.: Фармус Принт, 1998.
23. Минеев В.И., Нестерович И.И., Оранская Е.С., Тафеев А.Л. Апоптоз и активность рибосомальных цистронов клеток периферической крови при бронхиальной астме. *Аллергология*. 2001; 1: 3–9.
24. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С., Терещенко Д.В. Спонтанный и глюкокортикоидиндуцированный апоптоз лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой: роль митохондрий и CD95 (APO-1). *Аллергология*. 2002; 1: 13–20.
25. Невзорова В.А., Коновалова Е.Н., Суворенко Т.Н., Пазич С.А. Апоптоз и CD95 антигенная детерминанта эффекторных клеток в индуцированной мокроте у больных бронхиальной астмой и хроническим обструктивным бронхитом. Материалы XI Национального конгресса по болезням органов дыхания. М., 2001: 124.
26. Порядин Г.В., Журавлева Н.Е., Салмаси Ж.М. Характеристика активационных антигенов лимфоцитов больных бронхиальной астмой в стадии ремиссии. Материалы XI Национального конгресса по болезням органов дыхания. М., 2001: 48.
27. Jeramias I, Herr I, Boehler T, Debatin KM. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28 (1): 143–152.
28. Martinez-Lorenzo MJ, Alava MA, Gamen S et al. Involvement of APO-2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 8 (9): 2714–2725.
29. Новиков В.В. Растворимые дифференцировочные антигены. Иммунотерапия рака: Материалы Европейской школы онкологов. М., 1999: 1–8.
30. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. *Иммунология*. 2007; 4: 249–253.
31. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально-значимых заболеваниях. Сообщение II. Исследование их роли при вирусных инфекциях. *Рос. биотерапевтический журнал*. 2005; 3: 131–142.
32. Hamzaoui A, Ammar J, Mekki F et al. Elevation of serum soluble E-selectin and VCAM-1 in severe asthma. *Mediators Inflamm.* 2001; 10 (6): 339–342.
33. Kato M, Nozaki Y, Yoshimoto T et al. Different serum soluble Fas levels in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Allergy*. 1999; 54 (12): 1299–1302.
34. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Под ред. Быкова А.С., Воробьева А.А., Зверева В.В. 2-е изд. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008: 201–254.
35. Григорьева Т.Ю., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. Различная чувствительность к индукции апоптоза Т-лимфоцитов субклассов CD4+ и CD8+. *Иммунология*. 2002; 4: 200–206.
36. Cheng J, Zhou I, Liu C et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994; 263: 1759–1762.
37. Gerke V, Moss SE. Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 331–371.
38. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы иммунологии. М.: Мир, 2006.
39. Булгакова В.А. Влияние вирусных инфекций на развитие и течение atopических болезней у детей. Автореф. ... канд. мед. наук. М., 2002.
40. Булгакова В.А., Балаболкин И.И., Сенцова Т.Б. Герпетическая инфекция у детей с аллергическими болезнями. *Детские инфекции*. 2006; 5 (1): 18–21.
41. Nash PB, Purner MB, Leon RP et al. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* 1998; 160: 1824–1830.
42. Маянский А.Н. Апоптоз и патология. В кн.: Микробиология для врачей (Очерки патогенетической микробиологии). Нижний Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 1999: 288–289.
43. Belanger C, Gravel A, Tomoiu A et al. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *J. Hum. Virol.* 2001; 4 (2): 62–73.
44. Аббасова С.Г., Липкин В.М., Трапезников Н.Н., Кушлинский Н.Е. Система FAS–FASL в норме и патологии. *Вопр. биол., мед., фарм. химии*. 1999; 3: 3–17.