



ВЛИЯНИЕ 3-НИТРОТИРОЗИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОСПАЛЕНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Л.М. ОГОРОДОВА
И.В. ПЕТРОВА
К.Ю. РУКИН

*Сибирский государственный
медицинский университет,
г. Томск*

e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Аллергическое воспаление дыхательных путей представляет собой каскад процессов с участием многих клеток и медиаторов и является сложным по регуляции. Важное место среди медиаторов занимает NO и его метаболиты. В результате действия активных форм NO развивается либо окислительный стресс, либо нитрозилирующий стресс с образованием нитритов, нитрозоаминов, 3-нитротирозина (3-НТ). В регуляции иммунного ответа и развитии аллергических реакций ключевую роль играют Т-регуляторные клетки, которые в условиях нитрозилирующего стресса созревают в присутствии высоких концентраций 3-нитротирозина. Цель исследования: установить влияние 3-нитротирозина на формирование иммунного ответа с участием Т-регуляторных клеток при аллергическом воспалении. В исследовании принимали участие больные легкой персистирующей и тяжелой астмой. Культивирование мононуклеаров проводили в присутствии 3-НТ и без него. Анализ субпопуляций Т-reg клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии. У пациентов с астмой количество регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4+CD25+ достоверно ниже, чем у здоровых доноров. Количество CD4+/CD25+high при тяжелой астме составило в 1,5 раза больше, чем при легкой астме и у здоровых доноров. Высокая концентрация 3-НТ при тяжелой астме приводит к увеличению популяции регуляторных клеток с фенотипом CD4+FOXP3+ и снижению количества CD4+CD25+ Treg.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дендритные клетки, 3-нитротирозин.

По современным представлениям воспаление дыхательных путей является основным морфологическим признаком бронхиальной астмы, определяющим ее клинико-функциональные проявления. Воспаление в бронхиальной стенке сопровождается интенсивным образованием токсических метаболитов NO и формированием нитрозилирующего стресса. В предыдущих исследованиях нами установлено, что накопление 3-нитротирозина (3-НТ) в дыхательных путях при тяжелой астме ассоциировано с формированием особого морфологического паттерна воспаления, признаками которого является снижение плотности эозинофилов, снижение объемной плотности реснитчатых эпителиоцитов и увеличение плотности нейтрофилов [1].

В регуляции иммунного ответа и развитии аллергических реакций ключевую роль играют Т-регуляторные клетки (Т-reg) [2]. Субпопуляция Т-регуляторных клеток фенотипически и функционально является гетерогенной, что дает основания полагать, что морфологический паттерн воспаления связан с определенным типом Т-регуляторных клеток. Созревание и дифференцировка субпопуляций Т-регуляторных клеток происходит непосредственно в ткани. В условиях нитрозилирующего стресса Т-регуляторные клетки созревают в присутствии высоких концентраций 3-нитротирозина, который, возможно, влияет на реализацию супрессорного действия Т-регуляторных клеток на Th1 и Th2 лимфоциты либо путем прямой цитотоксичности, либо через формирование в очаге воспаления определенного цитокинового профиля.

Таким образом, важно установить влияние токсических метаболитов оксида азота, таких как 3-нитротирозин, на формирование фенотипа иммунного ответа при бронхиальной астме.

Материалы и методы. В исследовании участвовали больные легкой персистирующей (n=15) и тяжелой (n=15) бронхиальной астмой (мужчины и женщины, средний возраст 35,12±1,61 лет). Группу контроля составили практически здоровые доноры (средний возраст 34,25±2,33 лет). Диагноз и тяжесть заболевания определяли в соответствии с рекомендациями международного согласительного документа GINA.



Культирование мононуклеаров проводили в присутствии 3-НТ и без него: на 2,5 мл раствора Фиколла наслаивали 5 мл цельной гепаринизированной крови, центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин, собирали интерфазу в чистую пробирку, отмывали: 5-10 мл среды RPMI. Затем центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин. Супернатант сливали, осадок тщательно ресуспендировали. Доводили объем клеточной суспензии до 1 мл средой RPMI (10% FCS/RPMI). Рабочая концентрация клеток составляла 2×10^6 /мл. Помещали клетки в рабочие лунки планшета, добавляли 3-НТ в концентрации 10 нг/мл, инкубировали при 37°C 72 часа. Часть клеток инкубировали без добавления 3-НТ. После инкубации собирали содержимое лунок и переносили в центрифужные пробирки. Центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин, сливали надосадок, клетки ресуспендировали в 1 мл раствора (PBS+ЭДТА+азид Na+AB) и переносили в цитометрические пробирки. Добавляли соответствующие поверхностные АТ (анти-CD25, анти-CD4) и инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин. Затем клетки отмывали теплым раствором (PBS+ЭДТА+азид Na), хорошо ресуспендировали и заливали 1% параформальдегидом, инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте, затем заливали 3 мл раствора (PBS+ЭДТА+азид Na) и оставляли клетки на ночь в холодильнике. Затем клетки осаждали и заливали 1 мл 0,2% раствора Твин-20. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. После этого отмывали (PBS+ЭДТА+азид Na). Проводили инкубацию с внутриклеточными антителами (анти-FOXP3) при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин, после чего клетки отмывали в 3 мл раствора (PBS+ЭДТА+азид Na). Надосадок сливали и заливали клетки 0,5 мл фиксирующего раствора.

Анализ субпопуляций T-reg клеток (CD4+CD25+, CD4+CD25+(high), CD4+FOXP3+) осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (США) в соответствии с протоколом. Статистический анализ данных проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев, методов дискриминантного и лог-регрессионного анализа.

Результаты. T-клетки модулируют иммунный ответ, способствуют развитию клеточного (Th1) и гуморального (Th2) иммунитета, также они могут подавлять иммунный ответ. Присутствующая естественная популяция CD4+CD25+ T-клеток (T-reg) генерируется в тимусе, кроме того, на периферии может происходить индуцированная продукция CD4+ из нерегуляторных T-клеток. T-reg не препятствуют клеточной активации, но супрессируют текущий иммунный ответ и предотвращают развитие хронической иммунопатологии. В настоящий момент выделяют три основные субпопуляции регуляторных клеток: CD4+CD25+(high)-T-лимфоциты, или натуральные регуляторные клетки (T_{nr}), а также Th3 и Tr1, или индуцибельные регуляторные клетки (T_{ir}).

В результате анализа субпопуляции T-регуляторных клеток, полученных в отсутствие 3-НТ, установлено, что у пациентов с астмой количество регуляторных T-клеток с фенотипом CD4+CD25+ было достоверно ниже, чем у здоровых доноров ($31,06 \pm 2,1\%$ при легкой БА и $35,05 \pm 1,7\%$ при тяжелой БА против $41,81 \pm 3,9\%$ в группе контроля, $p < 0,05$) (табл. 1). T-регуляторные клетки выполняют протективную функцию при иммунопатологии, а их способность регулировать Th1 и Th2 ответ ослабляет проявление воспалительных реакций.

Количество CD4+/CD25+high при тяжелой астме составило $2,64 \pm 0,52\%$, что в 1,5 раза больше, чем при легкой астме и у здоровых доноров ($p < 0,05$) (табл. 1).

Характер воспаления у больных тяжелой БА, в отличие от пациентов, страдающих легкой формой заболевания, приобретает многие черты, присущие хронической обструктивной болезни легких, включая высокое содержание нейтрофилов в периферическом инфильтрате, признаки оксидативного и нитрозилирующего стресса и резистентность к терапии кортикостероидами. Некоторые авторы связывают изменения в картине воспаления как раз с накоплением субпопуляций клеток, имеющих фенотип CD4+CD25+(high) и Th17-клеток [3]. Регуляторная функция CD4+CD25+(high)-T-клеток осуществляется посредством оказания цитотоксического эффекта на клетку-мишень при помощи перфорина, гранзима А и CD18 без участия Fas (CD95) [4, 5]. Мишенями цитотоксичности могут быть рядом расположенные CD4+, CD8+-T-клетки, моноциты, дендритные клетки (ДК), антигенпрезентирующие В-клетки. Еще один ме-



ханизм супрессии периферических Т-клеток, используемый T_Hг – связывание молекул В7 (костимулирующие молекулы CD80, CD86) на клетках-мишенях, через которые идет негативный сигнал. Клетки-мишени с низким уровнем экспрессии В7 устойчивы к супрессорным влияниям CD4+CD25+(high) лимфоцитов [6].

Таблица 1

Фенотип Т-регуляторных клеток у пациентов с различной тяжестью бронхиальной астмы

Формы БА	CD4+CD25+, %	CD4+CD25+high, %	CD4+FoxP3+, %
Легкая персистирующая	31,06±2,1 p<0,05	1,36±0,34	7,09±1,1
Тяжелая	35,05±1,7 p<0,05	2,64±0,52 p<0,05 p1<0,05	9,91±1,4 p<0,05 p1<0,05
Группа контроля	41,81±3,9	1,56±0,21	8,13±0,9

p<0,05 по сравнению с группой контроля;
p1<0,05 по сравнению с легкой БА.

Одним из маркеров развития и функционирования Т-рег является молекула FoxP3 (Fork-head Box Protein 3), входящая в состав семейства белковых транскрипционных факторов (forkhead transcription factor). Foxp3 является важнейшим маркером дифференциации и развития CD4+CD25+ Treg. Мутации в гене FoxP3 вызывают сцепленный с X-хромосомой синдром (IPEX), включающий иммунодисрегуляцию. У пациентов с IPEX повышена частота встречаемости аутоиммунных и воспалительных заболеваний [6]. Генетический дефицит Foxp3 у мышей сопровождается чрезвычайно низким уровнем тимических и периферических Т-рег в сочетании с высоким риском развития аутоиммунных заболеваний, а разрушение эквивалента FoxP3 у мышей приводит к развитию аутоиммунных заболеваний и неконтролируемой лимфоидной пролиферации [Fehervari Z., Sakaguchi S. CD4(+) Tregs and immune control [7]. Установлено, что FoxP3 оказывает негативный эффект на активацию Т-клеток, вероятно, вследствие угнетения действия цитокинов, в частности, IL-2 [8, 9].

Экспрессия FoxP3 Т-регуляторными клетками при тяжелой астме достоверно выше, чем при легкой астме и в группе контроля (9,91±1,4% против 7,09±1,1% и 8,13±0,9% соответственно, p<0,05) (табл. 1). Увеличение количества Т-рег клеток и повышение экспрессии FoxP3 у пациентов с тяжелой БА может быть связано с адаптивным механизмом в ответ на хроническое аллергическое воспаление. Достоверных различий по экспрессии Foxp3 в Treg у больных легкой астмой и у здоровых доноров обнаружено не было.

В таблице 2 представлены результаты изучения влияния токсического метаболита оксида азота 3-нитротирозина на состав субпопуляции регуляторных клеток.

Таблица 2

Влияние 3-нитротирозина на состав субпопуляции Т-регуляторных клеток у пациентов с бронхиальной астмой

Формы БА	3-НТ, нг/мл	Фенотип Т-регуляторных клеток		
		CD4+CD25+, %	CD4+CD25+high, %	CD4+FoxP3+, %
Легкая	10	0,96±0,25 p<0,05	4,47±1,35 p<0,01	0,89±0,31 p<0,05
Тяжелая	10	0,87±0,40 p<0,05	13,58±5,11 p<0,05 p1<0,05	9,72±3,22 p<0,05 p1<0,05
Группа контроля	10	4,25±1,21	9,86±2,03	3,73±1,65

p<0,05 по сравнению с группой контроля;
p1<0,05 по сравнению с легкой БА.



При культивировании мононуклеаров (МН) больных легкой персистирующей бронхиальной астмой с 3-НТ в концентрации 10 нг/мл, количество CD4+CD25+(high)-Т-лимфоцитов составило 4,47±1,35%, что достоверно ниже, чем при тяжелой астме и в группе контроля (13,58±5,11% и 9,86±2,03% соответственно, $p < 0,01$). Число CD4+CD25+ и CD4+CD25+FoxP3+ Т-клеток составило 0,96±0,25% и 0,89±0,31% соответственно, что также достоверно ниже, чем у здоровых доноров (4,25±1,21% и 3,73±1,65%, соответственно, $p < 0,01$).

При культивировании МН больных тяжелой астмой с 3-НТ в концентрации 10 нг/мл количество CD4+CD25+(high) и CD4+CD25+FoxP3+ регуляторных Т-лимфоцитов было достоверно выше, чем при легкой астме и в группе контроля (табл. 2). В тоже время при тяжелой астме наблюдалась тенденция к снижению количества CD4+CD25+ Т-reg: 0,87±0,40% против 0,96±0,25% при легкой астме, однако различие было недостоверным. Наибольшее количество Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD25+ отмечено в группе контроля.

Высокая концентрация 3-НТ при тяжелой астме приводит к увеличению популяции регуляторных клеток, экспрессирующих FoxP3. С одной стороны клетки с фенотипом CD4+CD25+FoxP3 обладают супрессорной активностью в отношении эффекторных клеток и оказывают ингибирующий эффект на иммунные процессы, с другой являются важным фактором для стимуляции Т-регуляторных клеток. Кроме того, эти клетки выделяют TGF β , который является медиатором ремоделирования бронхов и своеобразным «панстимулятором» синтеза других факторов роста, концентрация которых повышена при ремоделировании тканей стенки бронхов. Факторы роста фибробластов, хондроцитов, остеобластов стимулируют избыточную пролиферацию соединительной ткани. Это соответствует морфологической картине воспаления при тяжелой астме, характеризующейся значительным утолщением базальной пластинки, высоким объемом соединительной и снижением доли железистой ткани.

В то же время, при тяжелой астме на фоне высокой концентрации 3-НТ наблюдается снижение количества CD4+CD25+ Treg, продуцирующих большое количество ИЛ-10 и обладающих супрессорной активностью. В патогенезе аллергических заболеваний ИЛ-10 представляет особый интерес. ИЛ-10 описан как ингибитор активности Th1, он способствует развитию гуморальной составляющей иммунного ответа, обуславливая аллергическую реактивность организма, подавляет развитие гиперчувствительности замедленного типа. ИЛ-10 подавляет продукцию провоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 активированными клетками. Он также подавляет экспрессию молекул МНС II класса, препятствует активации тучных клеток и эозинофилов, супрессирует функциональную активность макрофагов. Таким образом, действие ИЛ-10 направлено на подавление воспаления. Соответственно, уменьшение при тяжелой бронхиальной астме количества клеток, продуцирующих этот цитокин, приводит к персистенции воспаления и терапевтической резистентности.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии 3-НТ на формирование субпопуляции Т-регуляторных клеток и, как следствие, особого паттерна воспаления результатом которого является ремоделирование бронхиальной стенки, необратимая бронхообструкция и терапевтическая резистентность.

Список литературы

1. Козина, О.В. Вклад токсических метаболитов NO в формирование эозинофильного воспаления при бронхиальной астме / О.В. Козина, Л.М. Огородова, Е.А. Геренг и др. // Пульмонология. – 2009. – № 4. – С. 69–73.
2. CD4+ T cell response elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells / A.E. Morelli, J.P. Rubin, G. Erdos [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol.175. – P. 7905–7915.
3. Пухальский, А.Л. Влияние стероидной терапии на течение бронхиальной астмы / А.Л. Пухальский, Г. В. Шмарина, К. А. Зыков, В.А. Алешкин // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2009. – № 6. – С. 3–9.
4. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death / W.J. Grossman, J.W. Verbsky, W. Barchet [et al.] // Immunity. – 2004. – Vol.21. – P. 589–601.
5. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator / C.B. Thompson, J.P. // Immunity. – 1997. – Vol. 7, № 4. – P. 445 – 450.



6. «Иммунология» 7-е издание./ Д. Мейл [и др.] // М., 2007, 568 с..
7. CD4(+) Tregs and immune control / Z. Fehervari, S. Sakaguchi, W.J. Grossman, J.W. Verbsky, W. Barchet [et al.] // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol.114. – P. 1209–1217.
8. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells / B. Sadlack, J. Lohler, H. Schorle [et al.] // J. Eur. Immunity. – 1995. – Vol.25. – P. 3053 – 3059.
9. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function / A.M. Thornton, E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, E.M. Shevach // J. Immunol. – 2004. – Vol.172. – P. 6519–6523.

EFFECT OF 3- NITROTYROSINE ON THE FORMATION OF THE SUBPOPULATION OF T-REGULATORY CELLS IN AIRWAYS INFLAMMATION

Allergic airway inflammation is a cascade of processes involving many cells and mediators and a complex of regulation. Important place among the mediators is NO and its metabolites. As a result of the active forms of NO or oxidative stress develops, or nitrosilating stress with the formation of nitrites, nitrosamines, 3- nitrotyrosine. In the regulation of immune response and the development of allergic reactions play a key role of T-regulatory cells, which are under nitrosative stress ripen in the presence of high concentrations of 3-nitrotyrosine. Objective: to establish the effect of 3-nitrotyrosine on the immune response involving T-regulatory cells in allergic inflammation. The study involved patients with mild persistent and severe asthma. Cultivation of mononuclear cells was performed in the presence of 3-nitrotyrosine without him. Analysis of subpopulations of T-reg cells were analyzed by Flow Cytometric. In patients with asthma, the number of regulatory T cells with the phenotype CD4+CD25+ was significantly lower than in healthy donors. The number of CD4+CD25+ high in severe asthma was 1,5 higher than in mild asthma and in healthy donors. High concentrations of 3-nitrotyrosine in severe asthma leads to an increase in population of regulatory cells with the phenotype of CD4+FOXP3+ and decrease the number of CD4+CD25+ Treg.

L.M. OGORODOVA

I.V. PETROVA

K.Y. RUKIN

*Siberian State Medical University,
Tomsk*

e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Key words: bronchial asthma, dendritic cells, 3-nitrotyrosine.