

На правах рукописи

Лим Валерия Викторовна

**Роль негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3
и SOCS5 в системе негативной регуляции клеточной сигнализации
при бронхиальной астме**

14.01.25 - Пульмонология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2014

Работа выполнена на кафедре госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого Государственного образовательного учреждения Высшего Проффессионального Образования “Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова” Министерства Здравоохранения РФ.

Научный руководитель:

Сорокина Лада Николаевна

доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Мазуров Вадим Иванович

академик РАМН, заведующий кафедрой терапии с курсом ревматологии Северо-Западного государственного медицинского университета им.И.И.Мечникова, доктор медицинских наук, профессор

Казанцев Виктор Александрович

доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии ВМА МО РФ им.С.М.Кирова, профессор

Ведущая организация: Санкт-Петербургский Государственный университет

Защита диссертации состоится “ ” июня 2014 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д.208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском Государственном медицинском университете имени академика И.П.Павлова (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена 12, зал заседаний Ученого Совета, ауд.12, 6 этаж).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Первого Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6-8.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор медицинских наук,
профессор

Альберт Леонидович Александров

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Бронхиальная астма (БА), несмотря на появление все новых инновационных стратегий в диагностике и лечении этой хронической бронхолегочной патологии, возрастание арсенала лекарственных средств, по-прежнему, остается одной из важнейших проблем в современной пульмонологии и имеет все возрастающую социальную значимость (GINA, 2012). Вместе с тем, в последнее время, по данным различных источников (Илькович М.М. и др., 2007; Чучалин А.Г., Илькович М.М., 2009), отмечается неуклонный рост заболеваемости бронхиальной астмой, увеличивается ее распространенность во многих странах мира, составляя более 10% среди детей и 4-10% - среди взрослых.

Смертность и инвалидизация от этого многоликого заболевания также сохраняются высокими (Кокосов А.Н., 2005; Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011). В последние годы увеличилось количество больных с тяжелым неконтролируемым течением, среди которых велик процент лиц молодого возраста и детей, возрастает количество больных, имеющих лекарственную резистентность к проводимой терапии.

Такая ситуация ведет к необходимости разрабатывать современные инновационные пути решения вопросов диагностики и терапии БА с основательным анализом патогенетических механизмов бронхолегочной патологии (Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011), центральным дефектом которых является нарушение функционирования клеточного мембранно-рецепторного аппарата (Минеев В.Н., 2005) и различных звеньев межклеточной и внутриклеточной сигнализации (Barnes J.P., 2008).

Изучение механизмов развития бронхиальной астмы дало нам основание полагать, что в патогенезе заболевания важную роль играют нарушения регуляторных процессов, в частности, в системе негативной регуляции клеточной сигнализации.

Степень разработанности темы

В последнее время активно исследуется система SOCS-белков (супрессоры цитокиновой сигнализации –“Suppressors of cytokine signaling”), которая, обеспечивает функционирование различных сигнальных систем.

Одной из таких сигнальных систем, регуляцию которых осуществляет семейство SOCS-белков, является JAK-STAT сигнальная система (Janus Kinases – Signal Transducer and Activator of Transcription), обеспечивающая клеточную пролиферацию и дифференцировку. Она трансдуцирует множество цитокиновых сигналов и ростовых факторов. Ранее в ряде публикаций описывалась структурно-функциональная организация этой системы, а также особенности изменений этой системы при некоторых видах патологии (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И., 2010).

Предполагается, что SOCS1 с помощью IFN- γ ингибирует IL-4, предотвращая одновременную активацию двух альтернативных сигнальных

путей IL-4 и IFN- γ (Naka T., Tsutsui H., Fujimoto M., 2001; Fujimoto M., Naka T., 2003). Повышенная экспрессия SOCS1 может приводить к угнетению IL-13-индуцированного иммунного ответа в дыхательных путях по механизму отрицательной обратной связи (Matsumoto K., Aizawa H., Nakanishi Y. et al., 2009). С другой стороны, IL-4 и IL-13, активируя STAT6, могут одновременно индуцировать белки-регуляторы SOCS1 и SOCS3, приводя к угнетению IFN- γ - и TNF- α -сигнальных путей (Albanesi C., Fairchild H.R., Madonna S. et al., 2007). При этом SOCS3 может являться ключевым ингибитором по механизму отрицательной обратной связи различных цитокинов, преимущественно IL-6 и IL-10. Данный белок-регулятор транскрипции генов преимущественно экспрессирован в Th2-лимфоцитах и ингибирует Th1-дифференцировку (Kubo M., Inoue H., 2006).

SOCS3 рассматривается рядом авторов как потенциально важный противовоспалительный медиатор. Ранее было установлено наличие положительной корреляционной связи между экспрессиями SOCS3 и IL-10; в данном случае SOCS3 действует как медиатор противовоспалительных эффектов IL-10, способствуя формированию противовоспалительного фенотипа, поскольку IL-10 усиливает экспрессию SOCS3 (Davey M., Heath W.R., Starr R., 2006).

Известно, что SOCS5 вовлечен в регулирование клеточной Th-дифференцировки через торможение IL-4 сигнального пути, обеспечивающего дифференцировку в фенотип Th2 (Seki Y., Inoue H., Nagata N., 2003, Albanesi C., Fairchild H., Madonna S., 2007;)

В настоящее время считается, что SOCS1, SOCS3 и SOCS5 участвуют в Th-клеточной дифференцировке, влияют на баланс Th1/Th2-клеток и играют ключевую роль в патогенезе бронхиальной астмы.

Основываясь на результатах предыдущих исследований (Минеев В.Н., Сорокина, Л.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И., 2010), мы полагаем, что комплексное изучение компонентов негативной регуляции клеточной сигнализации, а также, детальное исследование SOCS5, позволит определить их роль в патогенезе бронхиальной астмы, и, по-видимому, позволит прогнозировать клинические особенности бронхиальной астмы и возможные варианты терапии.

Цель работы

Установить патогенетическую роль негативных регуляторов клеточной сигнализации - SOCS1, SOCS3, SOCS5 при различных вариантах бронхиальной астмы.

Задачи

1. Определить экспрессию мРНК SOCS1, SOCS3 и SOCS5 при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в сравнении с контрольной группой.
2. Оценить особенности экспрессии мРНК SOCS1, SOCS3, SOCS5 в фазе обострения и ремиссии бронхиальной астмы и при различной тяжести течения заболевания.

3. Установить изменение уровней экспрессии IgE и цитокинов (IL-4, IL-13, IL-10, IFN- γ) в связи с изменениями экспрессии негативных регуляторов SOCS1, SOCS3, SOCS5 при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в фазе обострения и ремиссии у больных с разной тяжестью течения бронхиальной астмы.

Научная новизна

– Впервые проведено исследование экспрессии супрессоров цитокиновой сигнализации SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови у больных аллергической и неаллергической бронхиальной астмой и выявлены особенности их экспрессии в зависимости от вариантов заболевания и его тяжести.

– Впервые определена роль SOCS5 системы негативной регуляции клеточной сигнализации в патогенезе бронхиальной астмы и его связь с клиническими особенностями заболевания.

– Впервые установлены особенности экспрессии SOCS5 в лимфоцитах периферической крови у больных аллергической и неаллергической бронхиальной астмой в зависимости от фазы и тяжести течения заболевания.

– Впервые показано кооперативное действие супрессоров цитокиновой сигнализации SOCS1, SOCS3, SOCS5 в регуляции транскрипционных факторов при бронхиальной астме и установлено нарушение баланса уровней экспрессии этих негативных регуляторов в зависимости от клинико-патогенетических особенностей бронхиальной астмы и проводимой терапии.

Практическая ценность работы

- Разработан комплексный подход к анализу уровней экспрессии негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови у больных бронхиальной астмой, что позволит определять степень нарушения контроля клеточной сигнализации в системе JAK-STAT, и может служить дополнительным критерием к выбору лечебного подхода с использованием современной таргетной терапии (в частности, ингибиторы JAK3, SOCS-подобные пептиды, блокаторы SOCS белков).

- Нами охарактеризован подтип бронхиальной астмы с высокими значениями сывороточного общего иммуноглобулина E, характеризующийся изменениями экспрессии SOCS-регуляторов цитокиновой сигнализации, что может иметь важное практическое значение при проведении дифференциальной диагностики в клинически сложных случаях.

- Влияние IL-4 на экспрессию мРНК SOCS1 при АБА и мРНК SOCS3 при НАБА может быть использовано для разработки новых лекарственных препаратов (новых лечебных “стратегий будущего”), направленных на восстановление негативной регуляции.

Ценность научных работ соискателя

Результаты проведенных исследований внедрены в лечебную практику пульмонологического отделения клиники госпитальной терапии ГБОУ ВПО “Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова” Министерства Здравоохранения РФ (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-54-51, vnmineev@mail.ru, www.spb-gmu.ru), а также межклинического аллергологического отделения ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-24-75, www.spb-gmu.ru) и консультативно-диагностического центра на базе поликлиники №31 Петроградского района Санкт-Петербурга (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 499-71-60, <http://poliklinika-31-spb-gmu-im.spb24.net>).

Методология и методы исследования

Методология проводимого исследования включает в себя различные этапы внутриклеточной регуляции белками-супрессорами цитокиновой сигнализации (SOCS1, SOCS3 и SOCS5): внеклеточный уровень оценивается по концентрации цитокинов, цитоплазматический и постраскрипционный уровни анализируются по экспрессии изучаемых регуляторов и мРНК данных регуляторов.

Моделью исследования выбраны лимфоциты периферической крови. После получения венозной крови, не позднее чем через 40 мин, проводили выделение клеток методом центрифугирования в градиенте плотности. Полученную лейкоцель из смешанной с ЭДТА крови, наслаивали на градиент плотности в соотношении 2:1 и центрифугировали 30 минут при 400 g. “Кольцо” мононуклеаров отбирали, полученную взвесь трижды отмывали раствором хлорида натрия (9 г/л, рН=7,2) и доводили концентрацию до 2×10^6 клеток/мл. Проводили инкубацию выделенных клеток в течение 60 минут в среде IMDM при 37 °С в чашках Петри для осаждения моноцитов на пластик. После инкубации собранная взвесь лимфоцитов дважды отмывалась в среде IMDM при 1200 оборотах в минуту в течение 10 минут. Итоговое количество клеток доводили до концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток в 1 мл среды IMDM.

Для инкубирования лимфоцитов с IL-4 использовался IL-4 (Prospec, Израиль) в концентрации 10 нг/мл. Инкубация проходила в течение 24 часов при 37°С в среде IMDM.

Экспрессия мРНК негативных регуляторов транскрипции SOCS1, SOCS3, SOCS5 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой исследовалась методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR).

Работа выполнялась на базе лаборатории НМЦ по молекулярной медицине на базе ПСПб ГМУ им. И.П. Павлова, при непосредственном методическом содействии старшего научного сотрудника к.м.н. Сысоева К.А.

Праймеры для SOCS1, SOCS3, SOCS5 и β -актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank):

1. SOCS1 5': 5'- CTGGGATGCCGTGTTATTTT -3' и SOCS1 3': 5'- TAGGAGGTGCGAGTTCAGGT -3'.
2. SOCS3 5': 5'- GCCACCTACTGAACCCTCCT -3' и SOCS3 3': 5'- GGTCTTCCGACAGAGATG -3'.
3. SOCS5 5': 5'- TGTGAGCCCACATTCAACAT -3' и SOCS5 3': 5'- ATGGGTATGGCTGTCTCCAG -3'.
4. β -актин 5': 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT -3' и β -актин 3': 5'- GAAGCATTTGCGGTGGACGAT -3'.

Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровни экспрессии мРНК SOCS1, SOCS3, SOCS5 оценивали относительно уровня β -актина.

Исследование экспрессии белков SOCS1 и SOCS3 методом иммуноблоттинга. Работа выполнена на базе отдела "Внутриклеточной сигнализации и транспорта" НИИ Цитологии РАН, при непосредственном методическом содействии старшего научного сотрудника, к.х.н. Буровой Е.Б.

Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham). Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую плёнку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция). Для специфического выявления белков использовали поликлональные анти-SOCS1, анти-SOCS3 антитела в разведении 1:1000 (Cell Signaling Technology, США).

В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1:10000 (GAR-HRP, Cell Signaling Technology, США); козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1:10000 (GAM-HRP, Sigma Aldrich, США).

Уровень белка определяли по уровню β -актина с использованием соответствующих моноклональных антител в разведении 1:20000 (Sigma Aldrich, США).

Активацию лимфоцитов проводили добавлением 10 ng/ml IL-4 (Sigma Aldrich, США) в течение 60 мин. После окончания инкубации лимфоциты помещали на лёд и все дальнейшие процедуры проводили при +4°C.

Определение концентрации общего IgE сыворотки крови. Работа выполнена на базе лаборатории НМЦ по молекулярной медицине ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Определение концентрации общего IgE сыворотки проводилось методом ИФА с применением стандартной методики при использовании коммерческих наборов (DRG, Германия) на ИФА-анализаторе BioTek ELx800 с длиной волны 450 нм с построением калибровочной кривой «от точки к точке».

Определение концентрации цитокинов плазмы. Работа выполнена на базе лаборатории НМЦ по молекулярной медицине на базе ПСПбГМУ им.

И.П. Павлова, при непосредственном методическом содействии старшего научного сотрудника, к.м.н. Сысоева К.А.

Определение уровня цитокинов проводилось по стандартному протоколу Bio-Plex на проточном флюориметре Bio-Rad-Plex с использованием 3-х наборов: Bio-Plex Human Serum Diluent Kit, 96 well; Bio-Plex Cytokine Reagent Kit, 96 well; Bio-Plex Human Cytokine Th1/Th2 Panel Kit, 96 well; с применением технологии xMAP (селективное связывание определяемых цитокинов и сорбированных на поверхности микрочастиц антител) по стандартной методике.

Методы статистической обработки. Для анализа результатов исследований была разработана специальная база данных на основе программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science for Windows, русифицированная версия 13.0).

Статистическую обработку результатов исследований (определение числовых характеристик выборок, оценку значимости различия оцениваемых параметров методами параметрической и непараметрической статистики, корреляционный анализ) проводили в соответствии с рекомендациями по обработке результатов медико-биологических исследований (Гланц М., Стентон А., 1992). Заключение о статистической значимости давалось при уровне вероятности ошибочного заключения не менее 0,05.

Степень достоверности результатов исследований

Работа выполнена на достаточном клинико-лабораторном материале.

Обоснованность выводов обусловлена репрезентативным материалом исследований, точностью выполнения методик исследования, большим количеством наблюдений, а также грамотной статистической обработкой.

Выводы диссертации логично обоснованы и вытекают из содержания проведенных исследований.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на “Булатовских чтениях” (Санкт-Петербург, 2011); на 22 Конгрессе Европейского Респираторного Общества (Vienna, Austria, 2012), на 23 Конгрессе Европейского Респираторного Общества (Barcelona, Spain, 2013), на международных молодёжных медицинских конгрессах (Санкт-Петербург, 2011), на заседании общества терапевтов Санкт-Петербурга, на пульмонологической секции (Санкт-Петербург, 2012).

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Из них 4 статьи, в том числе – 3 в журналах, рекомендованных ВАК.

Положения, выносимые на защиту

1. Для бронхиальной астмы характерны особенности взаимодействия супрессоров транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5, осуществляющих негативную регуляцию в системе JAK-STAT-сигналикации; и нарушения в их функционировании, в основе которых лежат дефекты негативного контроля, приводящие к изменениям в различных сигнальных системах.

2. Дефектность негативного регуляторного контроля в системе STAT-сигнализации проявляется на уровне супрессоров цитокиновой сигнализации SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови, что, возможно, связано с нарушением их кооперативных взаимодействий.

3. При аллергической и неаллергической бронхиальной астме имеются особенности в функционировании супрессоров цитокиновой сигнализации SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови, которые могут изменяться в зависимости от фазы и тяжести течения заболевания.

4. При БА глюкокортикостероиды проявляют модулирующее влияние в отношении супрессоров цитокиновой сигнализации SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови на разных уровнях клеточной сигнализации, особенно выраженное в группе больных с системной глюкокортикостероидной терапией.

Материалы исследования

Для решения поставленных в диссертационной работе задач были обследованы 171 человек: практически здоровых – 31 человек, больных бронхиальной астмой (БА) – 140 человек.

В группу практически здоровых лиц вошёл 31 человек: 12 мужчин (38,7%) и 19 женщин (61,3%). Средний возраст составил $31,71 \pm 10,21$. Для отбора практически здоровых лиц использовали следующие критерии: отсутствие хронических заболеваний; отсутствие признаков острых заболеваний в течение последнего месяца; неотягощённая наследственность по БА, аллергическим и другим заболеваниям; благоприятный аллергологический анамнез.

Было выделено две группы больных БА. В первую группу вошло 80 пациентов с аллергической (или преимущественно аллергической) бронхиальной астмой (АБА). Вторую группу составили 60 больных с неаллергической бронхиальной астмой (инфекционно-зависимым или преимущественно инфекционно-зависимым вариантом заболевания) (НАБА).

В группе больных БА было 60% женщин и 40% мужчин.

Обследованные подписали форму информированного согласия, утверждённую локальным этическим комитетом. Больным БА проводили стандартное клиническое, лабораторное и рентгенологическое обследование, аллергологическое тестирование, а также цитологическое исследование мокроты и смыва из бронхов на базе клиники госпитальной терапии им.акад. М.В.Черноруцкого ПСПб ГМУ им.акад.И.П.Павлова. Диагноз БА устанавливался в соответствии с критериями глобальной инициативы в диагностике, лечении и профилактике БА (GINA, 2012).

Сравнительная характеристика клинико-лабораторных признаков у больных АБА и НАБА представлена в таблице 1. Для больных АБА были характерны достоверно более высокие средние значения уровня эозинофилов крови. При анализе СОЭ выявлено, что данный показатель значимо выше у больных НАБА.

Таблица 1

Сравнительная характеристика клинико-лабораторных признаков у больных обследованных групп

| Признак | АБА* | НАБА* | Достоверность различий ** |
|--|---------------|--------------|---------------------------|
| Средний возраст, лет | 40,61±14,45 | 54,84±14,06 | p <0,001 |
| Длительность заболевания, лет | 13,92±11,57 | 14,14±12,91 | p>0,05 |
| Возраст начала БА, лет | 26,57±15,62 | 40,74±15,87 | p <0,001 |
| Исследование крови: | | | |
| Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л | 7,3 ± 3,06 | 8,62 ± 7,58 | p>0,05 |
| СОЭ, мм/час | 8,73 ± 6,12 | 11,72 ± 9,29 | p>0,05 |
| Уровень эозинофилов в периферической крови (%) | 1,29±1,05 | 0,3 ± 0,26 | p <0,05* |
| Концентрация общего иммуноглобулина Е (IU/ml) | 218,31±210,31 | 98,96±83,54 | p <0,05* |
| Исследование мокроты: | | | |
| Лейкоциты (среднее количество в поле зрения) | 16,49±9,33 | 16,43±10,3 | p>0,05 |
| Эозинофилы (%) | 20,32±11,72 | 17,38±8,89 | p>0,05 |
| Нейтрофилы (%) | 39,18±15,63 | 43,54±16,00 | p>0,05 |
| Лимфоциты (%) | 10,44±3,44 | 8,31±2,80 | p<0,05* |
| Моноциты (%) | 3,5±2,85 | 2,64±3,00 | p>0,05 |
| Макрофаги (%) | 19,97±11,42 | 22,86±11,41 | p>0,05 |
| Исследование ФВД: | | | |
| ОФВ ₁ % к должному | 82,25±22,22 | 68,10±22,42 | p>0,05 |
| ОФВ ₁ % к должному после бронхолитика | 94,09±20,52 | 81,93±21,92 | p>0,05 |
| ПОС выдоха (% от должн.) до бронхолитика | 85,56±22,20 | 69,73±23,37 | p>0,05 |
| ПОС выдоха (% от должн.) после бронхолитика | 96,57±20,88 | 82,83±22,64 | p>0,05 |
| МОС50 выд, (% от должн.) до бронхолитика | 50,62±28,85 | 34,50±22,48 | p=0,001* |
| МОС50 выд, (% от должн.) после бронхолитика | 67,1±39,78 | 49,17±28,01 | p=0,032* |
| МОС75 выд (% от должного) | 38,89±29,69 | 22,19±17,31 | p<0,001* |

Примечание:

* - для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее значение и стандартное отклонение (M±σ) (параметрическая статистика);

** - уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения двух несвязанных выборок использован параметрический t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

Сравнительная характеристика анамнестических данных у больных обследованных групп представлена в таблице 2.

Таблица 2

Особенности анамнеза в исследованных группах пациентов (указано среднее значение, использован критерий χ^2 для качественных признаков)

| Признак | АБА | НАБА | Значимость различий |
|--|------|------|---------------------|
| Наличие отягощенного аллергологического анамнеза | 0,99 | 0,86 | p<0,05* |
| Наличие бытовой сенсibilизации | 0,94 | 0,74 | p<0,05* |
| Наличие пыльцевой сенсibilизации | 0,58 | 0,47 | p>0,05 |
| Наличие эпидермальной сенсibilизации | 0,68 | 0,38 | p<0,05* |
| Наличие пищевой сенсibilизации | 0,40 | 0,28 | p>0,05 |
| Наличие лекарственной непереносимости | 0,23 | 0,45 | p<0,05* |
| Наличие наследственной предрасположенности по аллергическим заболеваниям | 0,51 | 0,22 | p<0,05* |
| Наличие наследственной предрасположенности по БА | 0,58 | 0,43 | p>0,05 |
| Факт курения | 0,35 | 0,31 | p>0,05 |
| Сопутствующий аллергический ринит | 0,84 | 0,40 | p<0,05* |
| Сопутствующий хронический бронхит | 0,32 | 0,45 | p>0,05 |
| Сопутствующая кардиологическая патология | 0,32 | 0,76 | p>0,05 |
| Сопутствующий сахарный диабет | 1,03 | 1,12 | p<0,05* |
| Сопутствующая патология щитовидной железы | 0,12 | 0,22 | p>0,05 |
| Сопутствующая патология ЖКТ | 0,29 | 0,64 | p<0,05* |
| Сопутствующая нефрологическая патология | 0,14 | 0,28 | p>0,05 |
| Сопутствующий сахарный диабет | 1,03 | 1,12 | p<0,05* |
| Сопутствующая патология щитовидной железы | 0,12 | 0,22 | p>0,05 |

Примечание:

статистически значимые различия отмечены знаком *

Обследование проводили в фазе обострения и в фазе ремиссии заболевания. Комплекс лечебных мероприятий у больных БА полностью соответствовал варианту заболевания. Больные получали медикаментозную терапию в соответствии со стандартами лечения (GINA, 2012).

Результаты исследования и их обсуждение

Для обобщения полученных результатов экспрессии негативных регуляторов SOCS1, SOCS3 и SOCS5 нами составлена таблица, позволяющая систематизировать сформированные представления (таблица 3).

Как видно из таблицы 3, больные АБА характеризуются в целом более выраженными изменениями экспрессии всех трёх исследованных нами супрессоров цитокиновой сигнализации (SOCS1, SOCS3 и SOCS5) как исходно, так и в условиях действия IL-4. При НАБА отмечаются выраженные изменения экспрессии только SOCS3 и в меньшей степени SOCS5.

Таблица 3

Динамика уровней экспрессии SOCS1, SOCS3 и SOCS5
в обследованных группах

| | Контроль | АБА | НАБА |
|------------------|----------|-----|------|
| мРНК SOCS1 | N | ↓ | N |
| IL-4 мРНК SOCS1 | ↑N | ↑↑* | ↑N |
| Белок SOCS1 | N | ↓ | N |
| IL-4 Белок SOCS1 | ↑N | ↑↑* | ↑N |
| мРНК SOCS3 | N | ↓↓ | ↓ |
| IL-4 мРНК SOCS3 | ↑ | ↑ | ↑* |
| Белок SOCS3 | N | ↑ | ↑↑ |
| IL-4 Белок SOCS3 | ↑ | ↑ | ↑ |
| мРНК SOCS5 | N | ↑ | ↑ |
| IL-4 мРНК SOCS5 | ↓ | ↓ | ↓ |

Примечание: ↓ и ↓↓ - снижение экспрессии по сравнению с контрольной группой; ↑ и ↑↑ - повышение экспрессии по сравнению с контрольной группой; N – нормальные значения экспрессии, соответствующие контрольной группе; * - значимое изменение экспрессии под действием IL-4; ↑ N – экспрессия значимо не отличается от N.

Нами было показано, что для АБА характерно выраженное снижение экспрессии негативного регулятора транскрипции генов мРНК SOCS1 ($0,34 \pm 0,19$) и белка-регулятора SOCS1 ($0,09$ ($0,039$; $0,33$)) в лимфоцитах периферической крови, по сравнению с контрольной группой ($0,47 \pm 0,20$, $p=0,038$ и $0,41$ ($0,25$; $0,67$), $p=0,002$ соответственно) и группой больных НАБА ($0,46 \pm 0,25$, $p=0,009$ и $0,43$ ($0,30$; $0,65$), $p<0,001$ соответственно), что

представляется достаточно закономерным, учитывая выявленное нами повышение основного индуктора данного супрессора цитокиновой сигнализации IFN- γ у данной группы больных. При этом у больных АБА нами выявлена наиболее высокая способность SOCS1 к активации IL-4 в условиях действия IL-4, проявляющаяся в нарастании экспрессии как мРНК SOCS1 ($0,52 \pm 0,19$ и $0,34 \pm 0,19$; $n=18$; $p=0,013$), так и белка-регулятора SOCS1 ($0,14$ ($0,041$; $0,36$) и $0,09$ ($0,039$; $0,33$); $n=58$; $p=0,005$), что подтверждает многофункциональную роль этого супрессора цитокиновой сигнализации, участвующего в регуляции различных сигнальных путей.

Представляется также интересным, что у больных БА с уровнем IgE > 120 МЕ/мл (выше лабораторной нормы) отмечаются более высокие уровни экспрессии SOCS1 ($0,54 \pm 0,71$; $p=0,046$) и мРНК SOCS1 ($0,43 \pm 0,24$; $p=0,019$), чем в группах с низким показателем IgE ($0,30 \pm 0,38$; $n=46$; $p=0,046$, для SOCS1 и $0,33 \pm 0,20$, $n=50$, $p=0,019$ для мРНК SOCS1) что позволяет предполагать повышение экспрессии данного негативного регулятора в ответ на активацию IL-4 сигнализации.

При анализе отдельно по группам АБА и НАБА уровней экспрессии белка SOCS1 значимых различий между фазой обострения и ремиссии не обнаружено. В то же время, при исследовании уровня экспрессии мРНК SOCS1 в динамике у больных НАБА, нами выявлено выраженное нарастание экспрессии мРНК SOCS1 в фазе ремиссии БА у данной группы ($0,31 \pm 0,21$ и $0,52 \pm 0,42$; $n=24$; $p=0,049$). При этом в условиях действия IL-4 подобных отличий не отмечается.

Данный факт, по-видимому, позволяет предполагать, что в условиях обострения БА наблюдаемое снижение мРНК SOCS1 может быть обусловлено повышением активности IL-4 сигнализации. Отсутствие изменений при АБА косвенно может свидетельствовать о сохранении нарушений регуляции экспрессии мРНК SOCS1 и в фазе ремиссии.

Рассмотрение влияния терапии системными ГКС (парентеральными и пероральными) на уровень экспрессии негативного регулятора транскрипции генов SOCS1 дало основания утверждать, что у больных БА, получающих терапию системными ГКС ($0,48$ ($0,32$; $0,98$)), уровень экспрессии выше, чем у больных БА, не получающих такую терапию ($0,18$ ($0,02$; $0,41$)), и становится сопоставим с уровнем экспрессии в контрольной группе ($0,41$ ($0,25$; $0,67$)). Это согласуется с данными литературы (Chinenov Y., Rogatsky I., 2007), свидетельствующими о том, что ГКС индуцируют экспрессию мРНК SOCS1, однако механизмы данного процесса остаются до конца не изученными.

Выявленные нами корреляционные связи позволяют заключить, следующее: спектры корреляционных связей при АБА и НАБА различны, что может указывать на вероятное существование особенностей в патогенезе этих вариантов заболевания; очевидна роль SOCS1 в механизмах утяжеления заболевания.

Так, представляется важным и характерным выявление нами при АБА положительных корреляционных связей между уровнем экспрессии SOCS1 и

наличием аллергических заболеваний (0,34; n=62; p=0,007), бытовой сенсibilизации (0,284; n=63; p=0,024), тяжестью АБА (0,23; n=58; p=0,029), концентрацией IL-4 (0,771; n=14; p=0,001), что отражает его регуляторную роль в клеточной сигнализации.

Не менее интересны и показательны корреляционные связи, выявленные нами при НАБА. Отрицательная связь средней силы между уровнем белка-регулятора SOCS1 (существенно, в условиях действия IL-4) и дозой парентеральных ГКС в первый день курсовой противовоспалительной терапии (-0,326; n=55; p=0,015), может, по-видимому, служить маркером утяжеления заболевания: другими словами, чем меньше уровень экспрессии белка-регулятора SOCS1, тем в большей дозе парентерального ГКС нуждается больной при поступлении.

Таким образом, можно предположить, что полученные нами изменения экспрессии негативного регулятора транскрипции генов SOCS1 связаны с клиничко-патогенетическими особенностями БА и, вероятно, отражают концепции генетической детерминированности биологических дефектов, а также, гетерогенности и комплексности нарушений регуляции сигнальных систем при этом заболевании.

При исследовании особенностей экспрессии негативного регулятора транскрипции генов SOCS3 отмечено, что у больных БА (как АБА (0,171 (0,086; 0,386); p=0,042), так и НАБА (0,217 (0,069; 0,328); p=0,047)) отмечается уменьшение уровня экспрессии мРНК SOCS3 по сравнению с контрольной группой (0,262 (0,153; 0,460)), более выраженное у больных АБА. Противоположную направленность имеет картина изменения экспрессии белка-регулятора SOCS3: у всех больных БА (как АБА (0,427 (0,274; 0,869); p=0,020), так и НАБА (0,552 (0,285; 0,792); p=0,007)) отмечается нарастание уровня экспрессии SOCS3 по сравнению с контрольной группой (0,259 (0,110; 0,516)).

При этом в условиях действия IL-4 отмечается нарастание экспрессии мРНК SOCS3 (0,217 (0,069; 0,328) и $0,40 \pm 0,25$; p=0,05) во всех обследованных группах, более существенное в группе больных НАБА.

У больных БА, получающих терапию системными ГКС (парентеральными (0,59 (0,34; 0,98)) и пероральными (0,65 (0,4; 1,07))), уровень экспрессии белка-регулятора SOCS3 существенно выше, чем в контрольной группе (0,26 (0,11; 0,52); p=0,001 и p=0,004 соответственно) и у больных БА, не получающих такую терапию (0,32 (0,25; 0,67) p=0,049 и p=0,02 соответственно).

Таким образом, для больных БА, получающих системную ГКС терапию, в целом характерно повышение экспрессии негативного регулятора SOCS3. При этом если уровни экспрессии мРНК SOCS3 на фоне терапии ГКС приближаются к нормальным значениям (относительно контрольной группы), то уровни экспрессии белка-регулятора SOCS3 превышают экспрессию контрольной группы более чем в 2 раза.

Исходя из вышеизложенного, повышение экспрессии мРНК SOCS3 при бронхиальной астме может рассматриваться как протективный ответ - ответ, направленный против выраженного воспалительного процесса. Данный факт может послужить основой в разработке принципиально новых терапевтических направлений (Daewoong J., Liu D., Yao S. et al., 2005).

Следует отметить, что SOCS3 может, по-видимому, участвовать в механизмах утяжеления АБА. Так, нами установлено, что у больных АБА уровни экспрессии мРНК SOCS3 повышены при тяжелом течении заболевания (0,513 (0,209;0,713); n=8) в сравнении с группой больных с легким (0,171 (0,070;0,378); n=27; p=0,012) и среднетяжелым течением заболевания (0,170 (0,099;0,359); n=27; p=0,037).

В этой связи представляют интерес выявленные нами в группе больных АБА отрицательные корреляционные связи между уровнем экспрессии белка SOCS3 и показателями исследования функции внешнего дыхания (ОФВ₁ исходно (-0,329; n=44; p=0,029) и после действия бронхолитика (-0,334; n=43; p=0,028) и МОС50 выдоха в % от должного после введения бронхолитика (-0,314; n=43; p=0,04) у больных АБА, которые могут характеризовать выраженность и тяжесть хронического воспаления у больных АБА. При этом выявленные существенные положительные корреляционные связи между уровнем экспрессии белка-регулятора и мРНК SOCS3 и тяжестью заболевания (0,350; n=44; p=0,020), и суточной дозой парентеральных ГКС (на день обследования) (0,275; n=55; p=0,042) могут также указывать на вероятную роль SOCS3 в механизмах утяжеления заболевания.

Отметим, что при НАБА значимых различий в экспрессии мРНК SOCS3 по степеням тяжести течения БА не отмечается. Уровни экспрессии белка-регулятора SOCS3 у больных АБА и НАБА существенно не меняются в зависимости от тяжести течения заболевания.

Следует отметить, что нами выявлено отсутствие статистически значимых различий между фазами обострения и ремиссии как у больных АБА, так и у больных НАБА, уровней экспрессии SOCS3 (мРНК и белка-регулятора).

Нами были исследованы особенности экспрессии негативного регулятора транскрипции генов SOCS5 у больных бронхиальной астмой и выявлено, что у больных АБА (0,97±0,38; p=0,045) и НАБА (1,07±0,38; p=0,006) отмечается выраженное повышение уровня экспрессии мРНК SOCS5 в лимфоцитах периферической крови по сравнению с контрольной группой (0,78±0,36) (в 1,24 раза и 1,37 раза соответственно), что, по-видимому, является результатом повышения IL-4 и IL-13 сигнализации при бронхиальной астме.

При этом в группе больных АБА с высоким уровнем сывороточного общего IgE экспрессия мРНК SOCS5 существенно выше по сравнению с группой больных с уровнем сывороточного общего IgE <120 МЕ/мл, что подтверждает роль повышения экспрессии SOCS5 в регуляции сигнализации IL-4 и IL-13.

Немаловажным фактом является зависимость уровня экспрессии мРНК SOCS5 от степени тяжести заболевания АБА. При лёгкой степени АБА ($0,69 \pm 0,26$;) он ниже, чем при средней ($0,98 \pm 0,37$) и тяжелой АБА ($1,02 \pm 0,21$). Различий в уровнях экспрессии мРНК SOCS5 при средней и тяжелой АБА не отмечается. В этой связи представляют интерес выявленные нами отрицательные корреляционные связи мРНК SOCS5 при АБА с показателями скорости и сопротивления дыхательных путей при исследовании функции внешнего дыхания МОС50 выдоха в % от должного до бронхолитика ($-0,219$; $n=52$; $p=0,022$) и МОС50 выдоха в % от должного после бронхолитика ($-0,202$; $n=51$; $p=0,036$), что может косвенно отражать его роль в механизмах утяжеления заболевания.

Проанализированные нами корреляционные связи экспрессии мРНК SOCS5 с различными клинико-лабораторными показателями также позволяют предполагать различие патогенетических механизмов при АБА и НАБА, а также роль SOCS5 в механизмах утяжеления заболевания (более выраженная у больных АБА). Отметим, что при НАБА уровни экспрессии мРНК SOCS5 значимо не меняются в зависимости от степени тяжести заболевания. Исследование по группам АБА и НАБА уровней экспрессии мРНК SOCS5 значимых различий между фазой обострения и ремиссии не выявило.

При анализе влияния ГКС на экспрессию мРНК SOCS5 нами показано, что больные БА, получающие системную ГКС терапию, имеют значительно более высокие показатели экспрессии мРНК SOCS5 ($1,07 \pm 0,39$), в сравнении с контрольной группой ($0,78 \pm 0,36$; $p=0,010$). Что касается больных, не получающих терапию системными ГКС ($0,84 \pm 0,31$) (в том числе, больных с ингаляционной терапией ГКС ($0,76 \pm 0,26$)), то их значения экспрессии мРНК SOCS5 сопоставимы с контрольной группой.

С целью интегральной характеристики исследованных нами негативных регуляторов транскрипции генов нами был разработан интегральный коэффициент, учитывающий баланс соотношений их уровней экспрессии у каждого обследованного и рассчитываемый как произведение экспрессий мРНК всех трёх супрессоров цитокиновой сигнализации:

$$E_i = \text{мРНК SOCS1} \cdot \text{мРНК SOCS3} \cdot \text{мРНК SOCS5}$$

Анализируя указанный коэффициент для изученных показателей экспрессии в обследованных группах в сравнении с группой контроля ($E_i = 0,091$ ($0,04$; $0,17$)), можно сделать вывод об изменении SOCS-регуляции при БА. При этом в группе больных АБА отмечается существенное снижение рассчитанного нами коэффициента ($E_i = 0,046$ ($0,012$; $0,11$); в сравнении с контролем $p=0,019$), что, по-видимому, может рассматриваться как комплексное изменение кооперативной регуляции с помощью супрессоров цитокиновой сигнализации, в основе которого лежат дефекты негативного регуляторного контроля. НАБА, напротив, характеризуется некоторым повышением значений данных коэффициентов ($E_i = 0,149$ ($0,037$; $0,22$); в сравнении с контролем $p=0,614$ и в сравнении с АБА $p=0,002$), что косвенно

позволяет предполагать индукцию SOCS-регуляции в ответ на повышенную цитокиновую сигнализацию у этой группы больных.

Выявленные нами особенности экспрессии супрессоров цитокиновой сигнализации, вероятно, могут указывать на существование нарушений негативной регуляции клеточной сигнализации у больных БА.

Полученные данные позволяют рассматривать сложность нарушений регуляции, возникающих на различных уровнях клеточной сигнализации, с позиций полифункциональности молекул семейства негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5, обеспечивающих комплексный контроль цитокиновой сигнализации одновременно в различных сигнальных путях.

Выводы

1. При бронхиальной астме в фазе обострения в лимфоцитах периферической крови выявлены изменения в уровнях экспрессии негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5, соответствующие варианту заболевания и его тяжести.

2. Для АБА характерно снижение уровней экспрессии мРНК SOCS1 и мРНК SOCS3 и повышение мРНК SOCS5 по сравнению с контрольной группой в лимфоцитах периферической крови. Уровни экспрессии SOCS1, SOCS3 и SOCS5 при АБА имеют зависимость от тяжести течения, достигая максимальных значений при тяжелом течении, что может играть патогенетическую роль в утяжелении заболевания.

При АБА в фазе ремиссии не выявлено изменений уровней экспрессии SOCS1, SOCS3 и SOCS5, что косвенно может свидетельствовать о сохранении нарушений регуляции экспрессии как проявления дефектности негативного контроля и в фазе ремиссии.

3. В группе больных АБА установлено наличие подгруппы с высоким уровнем IgE > 120 МЕ/мл, которая характеризуется нарастанием экспрессии SOCS1, мРНК SOCS1, мРНК SOCS5, что позволяет предполагать связь повышения экспрессии этих негативных регуляторов с активацией IL-4-сигнализации.

4. Для НАБА характерно снижение мРНК SOCS3 и нарастание мРНК SOCS5 по сравнению с контрольной группой в лимфоцитах периферической крови. Уровни экспрессии мРНК и белка SOCS1, SOCS3 и мРНК SOCS5 при НАБА не изменяются в зависимости от тяжести течения заболевания, что может быть обусловлено более частой встречаемостью тяжелого течения бронхиальной астмы у больных НАБА.

При НАБА в фазе ремиссии не выявлено изменений уровней экспрессии мРНК и белка SOCS3 и мРНК SOCS5, что косвенно может указывать на сохранение нарушений негативной регуляции и в фазе ремиссии.

5. При исследовании в условиях активации IL-4 установлено, что данный интерлейкин повышает экспрессию мРНК SOCS1 в лимфоцитах больных АБА и экспрессию мРНК SOCS3 в лимфоцитах больных НАБА, что

может свидетельствовать о функциональной роли этих негативных регуляторов при сдвиге Th1/Th2 баланса в сторону Th2.

6. При бронхиальной астме показано модулирующее влияние глюкокортикостероидов в отношении негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в лимфоцитах периферической крови, проявляющееся в нарастании уровней экспрессии SOCS1, SOCS3 и SOCS5 и особенно выраженное в группе больных с системной ГКС терапией.

Практические рекомендации

1. У больных АБА рекомендуется исследование спектра экспрессии SOCS1, SOCS3 и SOCS5 для оценки и прогнозирования тяжести течения заболевания.

2. Проведение исследования экспрессии SOCS1 и SOCS5 у больных АБА в подгруппе с повышением уровня сывороточного общего Ig E может быть рекомендовано при отборе больных для возможной таргетной терапии в диагностически сложных случаях.

3. Оценка экспрессии мРНК SOCS1 и белка SOCS1, снижающихся в фазе ремиссии НАБА, может быть использована для динамического наблюдения за течением заболевания и эффективностью терапии.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И. Роль SOCS-белков в негативной регуляции JAK-STAT сигнализации // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т.11. – № 2 – С.10-15.
2. Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия негативного регулятора транскрипции генов белка SOCS1 в мононуклеарах периферической крови больных бронхиальной астмой // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т.11. – № 2. – С.49-54.
3. Лим В.В., Сорокина Л.Н., Нема М.А., Липкин Г.И., Минеев В.Н. Исследование уровней экспрессии SOCS1 и SOCS3, представителей семейства негативных регуляторов JAK-STAT сигнальной системы, при бронхиальной астме // Труды VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье-основа человеческого потенциала. Проблемы и пути их решения». – 2012. - Том 7. – С.423.
4. Трофимов В.И., Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нема М.А., Лим В.В., Еремеева А.В. Значение кооперации транскрипционных факторов STAT6, STAT4, GATA3 И T-bet при бронхиальной астме // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т.13. – №1. – С.67-72.
5. Лим В.В., Сорокина Л.Н., Мэхинеев В.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия негативных регуляторов транскрипции генов SOCS3 и SOCS5 в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2014. – Том 16. – №2. – С.149-154.

6. Sorokina L., Mineev V., Lim V., Nyoma M., Ereemeeva A., Trofimov V. The complex role of SOCS1 expression in peripheral blood mononuclears of patients with bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* – 2012. – V.39, Suppl.56. – P.134.
7. Mineev V., Nyoma M., Sorokina L., Lim V., Ereemeeva A., Bedenko A., Ivanov V., Trofimov V. New outlook on the Th1/Th2-alternative signaling pathways in asthma // *Eur Respir J.* - 2013. - Vol. 42, Suppl.57. – P.88.
8. Sorokina L.N., Mineev V.N., Nyoma M.A., Lim V.V., Ereemeeva A.A., Ivanov V.A., Bedenko A., Trofimov V.I. The crucial role of the expression of negative regulator of gene transcription SOCS5 in asthma pathogenesis. *Eur. Respir. J.* – 2013. – V.42, no.57. – P.91.