

ФЕНОТИП БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С «СИНДРОМОМ T-bet»

Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Еремеева А.В., Нёма М.А.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Нашей целью была оценка значимости транскрипционного фактора T-bet при бронхиальной астме (БА). Всего обследовано 102 больных бронхиальной астмой (БА), контрольная группа была представлена практически здоровыми лицами (21 человек). В качестве модели исследования были выбраны мононуклеары периферической крови, выделенные на градиенте плотности с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров. При оценке индивидуальных уровней экспрессии транскрипционного фактора T-bet было выявлено, что часть больных характеризовалась высокими значениями экспрессии исследуемого транскрипционного фактора (уровень экспрессии T-bet >1,0). Больные БА с феноменом повышения уровня экспрессии T-bet характеризуются преимущественно тяжелым течением заболевания, нуждаются в терапии системными глюкокортикоидами и 2-агонистами, не имеют отягощенной наследственности по аллергическим заболеваниям, в подавляющем большинстве имеют избыточную массу тела и сопутствующую патологию, среди которой ведущее место занимают заболевания сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также патология желудочно-кишечного тракта. При исследовании полиморфизма rs324011 гена белка STAT6 у пациентов данной группы были выявлены генотипы СС и СТ, характерные для фенотипов с преимущественно тяжелым течением БА. Причем у больных с тяжелым течением БА они наблюдались в 100% случаев. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством аллеля Т в локусах и тяжестью течения БА ($r = 0,88$; $p = 0,002$), а также между распределением по генотипу (СС-СТ/ТТ) и абсолютным (л-1) и относительным (%) количеством эозинофилов в мокроте ($r = 0,79$; $p = 0,034$). Обнаруженный симптомокомплекс может быть назван как «синдром повышения T-bet», в основе которого лежит феномен «генетически детерминированной гетерогенности дефектов сигнальных систем». У лиц с повышенным уровнем экспрессии T-bet также было выявлено достоверное повышение уровней транскрипционных факторов STAT6 и STAT4. В совокупности представленные данные свидетельствуют о том, что выявленный нами феномен, вероятно, отражает нарушение Th1/Th2-баланса за счет повышения как Th1-, так и Th2-транскрипционной активности. Таким образом, у больных с бронхиальной астмой с повышенной экспрессией транскрипционного фактора T-bet выявлен симптомокомплекс, названный нами «синдром повышения T-bet» (уровень экспрессии T-bet > 1,0), который характеризуется преимущественно тяжелым течением заболевания и определенным фенотипом больных. Вероятнее всего, данная особенность вызвана генетически обусловленными дефектами сигнальных систем. Повышение экспрессии T-bet показано у молодых пациентов с легким течением и может являться прогностическим признаком.

Ключевые слова: бронхиальная астма, факторы транскрипции, T-bet, STAT4, STAT6, фенотип

Адрес для переписки:

Сорокина Лада Николаевна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (921) 403-90-35.
E-mail: lada_sorokina@mail.ru

Address for correspondence:

Sorokina Lada N.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tostoy str., 6-8.
Phone: 7 (921) 403-90-35.
E-mail: lada_sorokina@mail.ru

Образец цитирования:

Л.Н. Сорокина, В.Н. Минеев, А.В. Еремеева,
М.А. Нёма «Фенотип бронхиальной астмы
с «синдромом T-bet» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 1. С. 181-186.
doi: 10.15789/1563-0625-TSB-1874
© Сорокина Л.Н. и соавт., 2020

For citation:

L.N. Sorokina, V.N. Mineev, A.V. Eremeeva, M.A. Nyoma
“T-bet syndrome-associated bronchial asthma phenotype”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 181-186.
doi: 10.15789/1563-0625-TSB-1874
DOI: 10.15789/1563-0625-TSB-1874

T-bet SYNDROME-ASSOCIATED BRONCHIAL ASTHMA PHENOTYPE

Sorokina L.N., Mineev V.N., Ereemeeva A.V., Nyoma M.A.

First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. We aimed to evaluate a significance of T-bet transcription factor in bronchial asthma (BA). A total of 102 patients with BA were examined. The control group was represented by healthy subjects (21 people). The study model was represented by peripheral blood mononuclear cells isolated in a density gradient with standard method. It was found that some patients were characterized by high levels of transcription factor T-bet expression (T-bet > 1.0). The bronchial asthma patients with increased T-bet expression were often characterized by the severe disease, requiring therapy with systemic glucocorticoids and β_2 -agonists, did not have genetic predisposal for allergic diseases, the majority of them had excess body weight and concomitant morbidity (mainly, cardiovascular, gastrointestinal and endocrine disorders). The study of rs324011 polymorphism of STAT6 protein gene in these patients revealed CC and CT genotypes, mostly observed in severe BA. Moreover, they were observed in 100% patients with severe clinical course of BA. A positive correlation was found between the number of T allele presentation in loci, and BA severity ($r = 0.88$, $p = 0.002$), as well as between the distribution by genotype (CC-CT/TT), and absolute (counts per one L), and relative (%) number of eosinophils in the sputum ($r = 0.79$, $p = 0.034$). The detected associations may be referred to as “T-bet elevation syndrome”, being based on the phenomenon of “genetically determined heterogeneity of signaling system defects”. In individuals with an increased T-bet expression, a significant elevation of transcription factors STAT6 and STAT4 was also detected. Taken together, the presented data indicate that this phenomenon reflects a disturbance of the Th1 / Th2 balance, due to increase in both Th1 and Th2 transcriptional activity. Thus, the patients with bronchial asthma with increased expression of T-bet transcription factor revealed a symptom complex, which we have called “T-bet elevation syndrome” (T-bet > 1.0), which is characterized mainly by severe disease and a certain phenotype of patients. Most likely, this feature is caused by genetically determined defects of signaling systems. High T-bet expression has been observed in young patients with mild BA and can be a prognostic sign.

Keywords: bronchial asthma, transcription factors, T-bet, STAT4, STAT6, phenotype

Введение

В предыдущих работах нами [1] было показано, что уровень экспрессии транскрипционного фактора T-bet при аллергическом варианте бронхиальной астмы (АБА) обладал некоторыми особенностями: при утяжелении течения заболевания (вне связи с его фазой) эта величина уменьшалась в сравнении с группой практически здоровых.

Напомним, что фактор транскрипции T-bet (TBX21, T-box protein) принадлежит семейству TBX (T-box protein), представленному 18 белками [2]. T-bet играет роль ключевого фактора развития Th1- и Th1-связанной экспрессии $IFN\gamma$. Действие T-bet на T-хелперы 2 типа и T-хелперы 17 вело к превращению этих клеток в Th1-лимфоциты, которые синтезируют $IFN\gamma$ [3].

Также известно, что T-bet способен подавлять экспрессию GATA3, ключевого транскрипционного фактора Th2 [4]. Таким образом, с учетом имеющихся сейчас данных можно утверждать, что T-bet – один из главных факторов транскрипции, влияющих на патогенез и аллергического, и нервно-психического варианта бронхиальной астмы [5].

Наиболее сниженным уровнем экспрессии T-bet в мононуклеарах периферической крови характеризовалась группа пациентов с аллергическим вариантом БА: уровни T-bet в этой группе были ниже в 7 и 6 раз по сравнению со здоровыми лицами и больными неаллергическим вариантом БА соответственно. При этом между группами здоровых лиц и неаллергической БА не было значимых различий в уровнях T-bet [1].

Обнаруженное уменьшение уровней T-bet при аллергической БА – это, вероятно, следствие наследственно обусловленных дефектов при атопической конституции, ведущих к преобладанию Th2-опосредованного ответа и сохранению аллергического варианта воспаления при БА.

При оценке индивидуальных уровней экспрессии транскрипционного фактора T-bet было выявлено, что часть больных характеризовалась увеличенными уровнями экспрессии этого фактора транскрипции (значение экспрессии T-bet > 1,0). Это наблюдение – основа для дальнейшего внимательного исследования группы этих факторов. Нами были проанализированы основные характеристики данных больных.

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРУППЫ БОЛЬНЫХ С ФЕНОМЕНОМ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet (n = 10)

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH THE PHENOMENON OF INCREASED T-bet EXPRESSION (n = 10)

Показатель Parameter		n (%) больных в группе n (%)	Уровень значимости различий* P-value*
Наличие терапии системными глюкокортикоидами Glucocorticoid therapy	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Тяжесть течения БА Asthma severity	сред. moderate	3 (30%)	p > 0,05
	тяж. severe	7 (70%)	
Наследственность отягощена по аллергическим заболеваниям Hereditary allergic diseases	Да Yes	1 (10%)	p = 0,011
	Нет No	9 (0,9%)	
Наличие сопутствующей патологии Comorbidities	Да Yes	10 (100%)	–
	Нет No	0 (0%)	
Наличие кардиологической патологии Cardiovascular comorbidity	Да Yes	7 (70%)	p > 0,05
	Нет No	3 (30%)	
Наличие гастроэнтерологической патологии Gastroenterologic comorbidity	Да Yes	10 (100%)	–
	Нет No	0 (0%)	
Наличие эндокринной патологии Endocrine comorbidity	Да Yes	5 (50%)	p > 0,05
	Нет No	5 (50%)	
Наличие избыточной массы тела Overweight	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Наличие терапии на догоспитальном этапе Pre-hospital treatment	Да Yes	10 (100%)	–
	Нет No	0 (0%)	
Наличие терапии β2-агонистами на догоспитальном этапе Pre-hospital treatment with β2-agonists	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Возраст больных БА (лет) Age (years)	41-60	9 (90%)	p = 0,011
	> 71	1 (10%)	

Примечание. * – критерий χ^2 для качественных признаков.

Note. *, χ^2 -test.

Материалы и методы

Всего обследовано 102 больных бронхиальной астмой (БА), контрольная группа была представлена практически здоровыми лицами (21 человек). В качестве модели исследования были выбраны мононуклеары периферической крови (сепарированные с помощью градиента плотности и классического метода выделения мононуклеарных клеток).

Исследование экспрессии белков (STAT6, STAT4, GATA3, T-bet) методом иммуноблоттинга в мононуклеарах периферической крови

Концентрацию белка вычисляли методом Брэдфорд (1976), применяя овальбумин для представления калибровочной кривой.

Иммуноблоттинг и электрофорез

Разделение белков производили диск-электрофорезным методом в ПААГ с наличием SDS в варианте Laemmli (1970). Для визуализации полос белка применялся краситель Ронсеау S. Иммуноблоттинг выполняли методом ECL Western blotting protocols (Amersham). Хемилюминесцентное излучение фиксировалось на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция). Уровни экспрессии определяли по сравнению с уровнями β -актина.

Определение полиморфизма rs324011 гена белка STAT6

Для регистрации полиморфного варианта rs324011 гена STAT6 использовалась методика ПЦР с ДНК, полученной из лейкоцитов, рестрикцией и анализом длины и количества образовавшихся в результате рестрикции фрагментов цепи путем электрофореза в ПААГ. Олигонуклеотидные праймеры для участка интрона 2 гена STAT6 выбирались на основе известной последовательности 12 хромосомы AC018673 (GenBank). 216-нуклеотидный амплификат подвергался действию эндонуклеазы Ava II (Eco47I, Fermentas).

Анализ результатов проводился с применением программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science for Windows) (русифицированная версия 13.0). Вывод о значимости делался при уровне p не более 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования отражены в таблице 1.

Приведенные в таблице 1 данные показывают, что больные БА с феноменом увеличенной экспрессии T-bet отличаются преимущественно БА тяжелого течения заболевания, нуждаются в лечении системными глюкокортикостероидами и β -адреноагонистами, у них нет отягощенной

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ STAT4 И STAT6 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

TABLE 2. STAT4 AND STAT6 EXPRESSION IN DEPENDENCE OF T-bet EXPRESSION (INTEGRATED DENSITY TO β -ACTIN)

Показатель Parameter	Уровень экспрессии T-bet T-bet expression	n	Среднее, стандартное отклонение Mean, standard deviation	Уровень значимости различий* P-value*
Уровень экспрессии STAT4 STAT4 expression	$\geq 1,0$	20	0,93 \pm 0,70	p = 0,0001
	< 1,0	60	0,45 \pm 0,41	
Уровень экспрессии STAT4 в условиях инкубации с IL-4 STAT4 expression under IL-4 incubation	$\geq 1,0$	20	1,07 \pm 0,83	p = 0,005
	< 1,0	60	0,47 \pm 0,42	
Уровень экспрессии STAT6 STAT6 expression	$\geq 1,0$	26	0,95 \pm 0,87	p = 0,023
	< 1,0	76	0,60 \pm 0,56	
Уровень экспрессии STAT6 в условиях инкубации с IL-4 STAT6 expression under IL-4 incubation	$\geq 1,0$	26	1,07 \pm 0,83	p = 0,003
	< 1,0	76	0,50 \pm 0,42	

Примечание. * – t-критерий Стьюдента.

Note. *, Student's t-test.

наследственности по болезням аллергического ряда, многие имеют избыточную массу тела и сопутствующие заболевания, ведущую роль среди которых играют патологии эндокринной и сердечно-сосудистой систем, а также болезни пищеварительной системы.

Отметим также, что при анализе полиморфизма rs324011 гена фактора STAT6 у пациентов с феноменом повышенной экспрессии T-bet были обнаружены комбинации аллельных вариантов СС и СТ, характерные для больных бронхиальной астмой преимущественно тяжелого течения. При этом в группе больных именно с тяжелым течением БА они определялись у 100%. Для оценки влияния генотипа на клинические проявления заболевания нами был проведен корреляционный анализ, по результатам которого была выявлена положительная связь количества аллеля T в локусах и тяжести течения бронхиальной астмы ($r = 0,88$; $p = 0,002$), а также между распределением по генотипу (СС-СТ/ТТ) и абсолютным ($л^{-1}$) и относительным (%) количеством эозинофилов в мокроте ($r = 0,79$; $p = 0,034$). Выявленный, таким образом, симптомокомплекс может быть определен как «синдром повышения T-bet», в основе которого лежит феномен «наследственно запрограммированной разнородности дефектов сигнальных систем».

Отметим, что обнаружение данного феномена весьма важно, так как выраженное увеличение экспрессии T-bet было выявлено не только у больных, но и у некоторых здоровых лиц, которые в момент наблюдения не страдают никакими заболеваниями (ни аллергическими, ни неаллергическими) ($n = 6$).

Обратим внимание на то, что в генотипах пациентов этой группы (обозначенной как «скрытый синдром повышения T-bet») с довольно высокой частотой встречается цитозинный аллель (С) (доля участников исследования с аллелем С = 81,3; $n = 16$; $p = 0,012$). Поэтому весьма актуальным видится наблюдение подобных лиц в динамике для определения вероятности развития у них в будущем проявлений обнаруженного нами синдрома.

Также заметим, что у лиц с повышением экспрессии T-bet было выявлено значимое увеличение уровней факторов транскрипции STAT6 и STAT4, являющихся компонентами Th2- и Th1-внутриклеточных систем сигнализации соответственно (табл. 2).

В совокупности представленные факты указывают на то, что выявленный нами феномен, вероятно, отражает нарушение Th1/Th2-баланса за счет повышения как Th1-, так и Th2-транскрипционной активности.

Таким образом, у больных с бронхиальной астмой с повышенной экспрессией транскрипционного фактора T-bet выявлен симптомокомплекс, названный нами «синдром повышения T-bet» (уровень экспрессии T-bet > 1,0), который характеризуется преимущественно тяжелым течением БА и определенным фенотипом больных. Вероятнее всего, данная особенность вызвана генетически обусловленными дефектами сигнальных систем. Важно подчеркнуть, что значительное повышение экспрессии T-bet также показано у молодых пациентов с легким течением и может являться прогностическим признаком дальнейшего развития заболевания.

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Экспрессия транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 169-173. [Mineev V.N., Sorokina L.N. Expression of T-bet factor in peripheral blood cells in bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 169-173. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-169-173.
2. Ko F.W., Lun S.W., Wong C.K., Szeto C.C., Lam C.W., Leung T.F., Hui D.S. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 147, no. 3, pp. 526-532.
3. Lazarevic V., Chen X., Shim J.H., Hwang E.S., Jang E., Bolm A.N., Oukka M., Kuchroo V.K., Glimcher L.H. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 1, pp. 96-104.
4. Usui T., Preiss J.C., Kanno Y., Yao Z.J., Bream J.H., O'Shea J.J., Strober W.J. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 3, pp. 755-766.
5. Wilson V., Conlon F.L. The T-box family. *Genome Biol.*, 2002, Vol. 3, no. 6, reviews3008. doi: 10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008.
6. Zhu M., Liang Z., Wang T., Chen R., Wang G., Ji Y. Th1/Th2/Th17 cells imbalance in patients with asthma with and without psychological symptoms. *Allergy Asthma Proc.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 148-156.

Авторы:

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Еремеева А.В. — к.м.н., старший лаборант кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Eremeeva A.V., PhD (Medicine), Senior Laboratory Assistant, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 08.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 08.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 03.12.2019