

УДК 616-092

**УЧАСТИЕ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ I КЛАССА В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**© 2010 г. *Н.И. Кубышева*<sup>1</sup>, *Л.Б. Постникова*<sup>1</sup>, *Н.Б. Преснякова*<sup>2</sup>, *В.В. Новиков*<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского<sup>2</sup> Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной

nikma18@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2010

Изучены содержание растворимых молекул гистосовместимости I класса (sHLA-I) и уровень HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток у больных хронической обструктивной болезнью легких в различных биологических средах. С прогрессированием хронической обструктивной болезни легких на фоне снижения уровня HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в крови увеличивается уровень sHLA-I молекул в сыворотке крови, индуцированной мокроте и конденсате выдыхаемого воздуха.

*Ключевые слова:* иммунитет, растворимые молекулы гистосовместимости I класса, хроническая обструктивная болезнь легких.

Поиск новых маркеров активности воспаления и критериев тяжести хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) является одной из актуальных задач в патогенезе данного заболевания. В формировании хронического воспаления при ХОБЛ важная роль принадлежит накоплению в бронхиальном дереве макрофагов, нейтрофилов и активированных Т-клеток, особенно CD8-положительных Т-лимфоцитов [1], которые активируются при непосредственном участии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса.

Известен обширный класс интегрированных в глобальную иммунологическую сеть эндогенных иммунорегуляторных молекул, называемых растворимыми формами мембранных антигенов гемопоэтических клеток. Изучается их роль в регуляции иммунологических механизмов, в патогенезе различных заболеваний, исследуется мониторинговая и прогностическая значимость [2, 3]. Молекулы главного комплекса гистосовместимости обнаруживаются как в мембранно-связанной форме на поверхности клеток, так и в растворимой форме в различных биологических жидкостях. Их уровень изменяется при многих инфекционных, воспалительных, аутоиммунных, онкологических заболеваниях [2].

Учитывая актуальность поиска новых неиванзивных маркеров воспаления при ХОБЛ, целью настоящей работы явилось сравнительное исследование у больных ХОБЛ в различных биологических средах – периферической крови, индуцированной мокроте (ИМ) и конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) – содержания растворимых молекул HLA I класса и мононуклеарных клеток, положительных в реакции не-

прямой иммунофлуоресценции по мембранным молекулам HLA I класса.

**Материалы и методы**

В работе использованы образцы биологических жидкостей 63 больных с обострением ХОБЛ и 16 здоровых некурящих волонтеров сопоставимого возраста. Больные ХОБЛ составили 3 группы: 1 группа ( $n = 17$ ) – легкая степень тяжести заболевания (I стадия), 2 группа ( $n = 24$ ) – средняя степень тяжести (II стадия), 3 группа ( $n = 22$ ) – тяжелая степень ХОБЛ (III стадия). Диагноз устанавливали в соответствии с рекомендациями по диагностике и лечению ХОБЛ. Функцию внешнего дыхания (ФВД) исследовали на компьютерном спирографе «Jeger», Германия. Изучали объем форсированного воздуха за 1 секунду (ОФВ<sub>1</sub>), отражающий выраженность бронхиальной обструкции [1].

Индуцированную мокроту получали в соответствии со стандартной методикой [4]. Сбор конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) осуществляли по модифицированной методике, описанной ранее [5]. Относительное содержание мононуклеарных клеток, дающих в реакции непрямой иммунофлуоресценции положительную реакцию на поверхностные антигены HLA I класса (HLA-I<sup>+</sup> клетки), определяли с помощью моноклональных антител ИКО-53, используя люминесцентный микроскоп «Leitz» (Германия). Содержание растворимых молекул HLA I класса (sHLA-I) определяли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител ИКО-53 против альфа-цепи молекул HLA I класса и моноклональных антител

Таблица 1

## Содержание молекул sHLA-I в биологических средах больных ХОБЛ разной степени тяжести (Ед/мл)

Группа	Периферическая кровь	Индукцированная мокрота	Конденсат выдыхаемого воздуха
Здоровые волонтеры	1224.8±209.2	633.5±58.6	298.2±13.6
I стадия ХОБЛ	1513.2±223.4	617.4±113.4	270.1±45.7
II стадия ХОБЛ	1688.2±189.4	767.3±165.4	427.4±37.1*
III стадия ХОБЛ	2242.5±334.1*, **, ***	1431.7±208.6*, **, ***	560.2±50.1*, **, ***

\* – Статистически достоверные различия с нормой ( $p < 0.05$ ),

\*\* – статистически достоверные различия относительно I стадии ХОБЛ ( $p < 0.05$ ),

\*\*\* – статистически достоверные различия относительно II стадии ХОБЛ ( $p < 0.05$ ).

Таблица 2

Содержание HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток (%) в периферической крови и индуцированной мокроте у больных ХОБЛ

Группа	Периферическая кровь	Индукцированная мокрота
Здоровые волонтеры	70.2±8.1	54.1±8.4
I стадия ХОБЛ	56.6±8.9	37.6±3.7*
II стадия ХОБЛ	49.4±4.4*	59.2±5.8**
III стадия ХОБЛ	38.4±3.5**, **	41.0±4.7***

Примечание: см. пояснение под табл. 1.

ИКО-216 против бета-2-микроглобулина [6]. Результаты выражали в относительных единицах (Ед/мл). Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ «Биостатистика» и «Statgraf».

## Результаты и обсуждение

У здоровых волонтеров содержание растворимых молекул HLA I класса в сыворотке крови в 1.9 раза превышало их содержание в индуцированной мокроте и было в 4.1 раза выше уровня растворимых молекул HLA I класса в КВВ (табл. 1). Во всех тестируемых биологических жидкостях у больных ХОБЛ легкой степени тяжести содержание растворимых молекул гистосовместимости I класса не отличалось от нормы. При средней степени тяжести ХОБЛ сывороточный уровень sHLA-I имел тенденцию к повышению в крови и индуцированной мокроте, но статистически достоверное изменение в сторону повышения было зарегистрировано по сравнению с контролем только в КВВ ( $p < 0.05$ ). При III стадии ХОБЛ отмечалось статистически достоверное повышение содержания молекул sHLA-I во всех тестируемых биологических жидкостях. В сыворотке крови уровень молекул sHLA-I был увеличен в 2.0 раза ( $p < 0.05$ ), в индуцированной мокроте – в 2.3 раза ( $p < 0.05$ ), в КВВ превышал норму в 1.9 раза ( $p < 0.05$ ).

Выявлена статистически достоверная ( $p < 0.05$ ) отрицательная корреляция между параметром функции внешнего дыхания ОФВ<sub>1</sub>, отражающим выраженность бронхиальной обструкции, и концентрацией молекул

sHLA-I во всех исследуемых биологических средах (в периферической крови  $r = -0.47$ , в ИМ  $r = -0.57$ , в КВВ  $r = -0.54$ ). Обнаруженная связь свидетельствует о закономерном увеличении концентрации молекул sHLA-I с прогрессированием бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

Исследование HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток периферической крови показало их снижение с ростом тяжести заболевания. При легкой степени тяжести обнаруживалась лишь тенденция к падению относительного количества HLA-I<sup>+</sup> клеток (табл. 2). ХОБЛ средней тяжести характеризовалась снижением относительного уровня HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в 1.4 раза ( $p < 0.05$ ), а при III стадии заболевания относительное содержание HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток падало в сравнении с нормой в 1.8 раза ( $p < 0.05$ ). Выявлена отрицательная достоверная корреляция между содержанием молекул sHLA-I и относительным количеством HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в крови у больных с тяжелым течением ХОБЛ ( $r = -0.52$ ,  $p < 0.05$ ).

В индуцированной мокроте у больных ХОБЛ II стадии наблюдалось достоверное снижение относительного количества HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток только у больных легкого течения ХОБЛ в 1.4 раза по сравнению с нормой ( $p < 0.05$ ). При II и III стадиях заболевания процентное содержание данных клеток статистически не отличалось от контрольной группы. В то же время, у больных среднетяжелого течения уровень HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток достоверно повышался относительно I группы больных в 1.6 раза, а при тяжелом течении заболева-

ния содержание данных клеток падало по сравнению с содержанием у больными II стадии ХОБЛ в 1.4 раза ( $p < 0.05$ ).

Система HLA обеспечивает реализацию и регуляцию иммунного ответа не только за счет мембранных белков гистосовместимости, но и за счет их растворимых форм [2, 7]. Молекулы sHLA-I модулируют функцию клеток иммунной системы, связываясь с CD8 молекулой на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> натуральных киллеров, ингибируя их цитотоксическую функцию и индуцируя секрецию растворимого Fas-лиганда, который выступает в качестве аутокринного фактора и вызывает апоптоз этих клеток [3, 8]. Учитывая, что основная функция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и NK клеток состоит в противовирусной защите, можно предположить, что высокие концентрации молекул sHLA-I, подавляя и/или ограничивая деятельность данных клеток, являются одной из причин обострения ХОБЛ, в патогенезе которой важную роль часто играют вирусные агенты. Стоит подчеркнуть, что sFas-L может вызывать гибель не только цитотоксических клеток, но и клеток бронхолегочного аппарата [9] и, следовательно, усиливать деструкцию легочной ткани и прогрессирование хронического воспаления при ХОБЛ.

Известно, что антигены HLA I класса присутствуют на всех ядродержащих клетках, в том числе на мононуклеарных клетках. Однако в реакции непрямой иммунофлуоресценции выявляются, в основном, клетки с высокой плотностью экспрессии молекул HLA I класса, что отражает активацию клеточного иммунитета [3]. Вероятно, причиной обнаруженного нами снижения относительного количества HLA-I<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в крови является падение плотности их экспрессии на поверхности клеток, что может быть как следствием падения синтеза и пониженного выхода молекул HLA I класса на поверхность клетки, так и следствием увеличенной скорости их сбрасывания в межклеточное пространство [3, 7]. Поскольку мембранная форма молекул HLA I класса участвует в инициации

иммунного ответа, можно заключить, что снижение плотности экспрессии молекул HLA I класса является одним из элементов нарушения иммунитета при ХОБЛ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии молекул гистосовместимости I класса в патогенезе ХОБЛ. При этом содержание растворимых молекул HLA I класса может выступать в качестве показателя тяжести течения этого заболевания.

#### Список литературы

1. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких / Пер. с англ. Под ред. А.Г. Чучалина. М.: «Агросфера», 2007. 96 с.
2. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. 2007. № 4. С. 249–253.
3. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. Москва: Изд-во МИА, 2008. 243 с.
4. Efthimiadis A., Spanello A., Hamid Q., Kelly M.M. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation // Eur. Respir. J. 2002. V. 20. P. 19–23.
5. Horvath I., Donnelly L., Kiss A. et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998. V. 158. P. 1042–1046.
6. Максимова А.В., Кубышева Н.И., Ермолаева Е.В. и др. Сывороточное содержание растворимых антигенов адгезии и молекул гистосовместимости у детей с бронхиальной астмой // Аллергология. 2005. № 4. С. 30–34.
7. Puppo F., Indiveri F., Scudeletti M., Ferrone S. Soluble HLA antigens: new roles and uses // Immunology Today. 1997. V. 18. № 4. P. 154–155.
8. Kambayashi T., Michaelsson J., Fahlen L. et al. Purified MHC class I molecules inhibit activated NK cells in a cell-free system *in vitro* // Eur. J. Immunol. 2001. V. 31. P. 869–875.
9. Hodge S., Hodge G., Holmes M., Reynolds P.N. Apoptosis in COPD // Current Respiratory Medicine Reviews. 2005. V. 1. P. 33–41.

#### PARTICIPATION OF SOLUBLE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY CLASS I MOLECULES IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

*N.I. Kubysheva, L.B. Postnikova, N.B. Presnyakova, V.V. Novikov*

We investigated the content of soluble major histocompatibility class I molecules (sHLA-I) and the level HLA-I<sup>+</sup> of mononuclear cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease in various biological media. As the chronic obstructive pulmonary disease progresses, the sHLA-I level in the blood serum, induced phlegm and expired air condensate increases against the background of the decrease in HLA-I<sup>+</sup> blood mononuclear cells.

*Keywords:* immunity, soluble major histocompatibility class I molecules, chronic obstructive pulmonary disease.