

О.І. Лемко, Н.В. Вантюх, М.І. Попадинець

Науково-практичне об'єднання «Реабілітація» МОЗ України, м. Ужгород

Експресія маркерів апоптозу на лімфоцитах і нейтрофілах у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень

Ключові слова: хронічне обструктивне захворювання легень, апоптоз.

В останні роки встановлено, що апоптоз є не тільки фізіологічним процесом, який регулює об'єм клітинної маси та її функції в організмі, але за певних умов включається в механізми патогенезу багатьох захворювань [8, 9, 11]. Саме апоптозу та порушенням його регуляції належить одне з провідних місць у виникненні запалення, розвитку імунної недостатності, персистенції мікроорганізмів та звільненні організму хазяїна від екзогенних та ендогенних патогенів [3]. При запальних захворюваннях легень посилене пошкодження тканин може настати при активній міграції ефекторних клітин і уповільненні їх апоптозу, з іншого боку — завершення запального процесу може сповільнюватися при посиленні апоптозу імунокомпетентних клітин [2].

Метою даної роботи було вивчення особливостей процесів апоптозу імунокомпетентних клітин (лімфоцитів і нейтрофілів) у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) різного ступеня тяжкості.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 65 хворих на ХОЗЛ у фазі нестійкої ремісії та ремісії, які проходили стаціонарне лікування в НПО «Реабілітація», із них з легким та середньо-тяжким перебігом захворювання було по 21 пацієнту, з ХОЗЛ III ст. — 23. Для дослідження стану клітинного імунітету проводили визначення диференціальних антигенів лімфоцитів людини методом непрямой імунофлюоресценції за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до маркерів CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺ виробництва ОТК «Сорбент» (Росія). З метою вивчення активації імунокомпетентних клітин та готовності їх до апоптозу оцінювали рівень спонтанної експресії на поверхні лімфоцитів та нейтрофілів Fas-рецепторів (CD95 антигену), HLA-ABC, HLA-DR, внутрішньоклітинного білка p53. У роботі були використані МКАТ виробництва Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України. Крім того, досліджували інтенсивність спонтанного та індукованого аутосерваткою апоптозу нейтрофілів

за методикою Н.А. Маянського у модифікації [4]. Результати лабораторних досліджень оброблені методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Excel та критерію Фішера—Стьюдента. Зміни вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У механізмах імунного захисту макроорганізму основна роль належить широкому спектру ефекторних клітин адаптивного імунітету. Порівняно з показниками практично здорових людей, у хворих на ХОЗЛ відмічається порушення CD-фракційного складу лімфоцитів (таблиця). Так, встановлено достовірне зниження відносної кількості загальних Т-лімфоцитів (CD3⁺), субпопуляції хелперів-індукторів (CD4⁺) та зменшення співвідношення CD4⁺/CD8⁺ на фоні нормального рівня CD8⁺-клітин. До функції CD4⁺-лімфоцитів належать розпізнавання антигену, продукція лімфокінів та, як наслідок, запуск і регуляція всіх Т-клітинно-залежних реакцій. Тому наростання їх дефіциту є переконливим свідченням вираженої дискордантної роботи імунної системи у даного контингенту пацієнтів. Достовірно вищими за показники норми виявилися рівень недиференційованих 0-лімфоцитів, що, ймовірно, пов'язано з виходом функціонально активних клітин у вогнище запалення, а також вміст В-лімфоцитів (CD22⁺).

Апоптоз має особливе значення для реалізації контролю над імунною системою, тому що саме для її клітин характерною є здатність до розмноження протягом усього життя [2]. При аналізі рівня показників, які характеризують процеси апоптозу, було встановлено надмірний рівень експресії CD95⁺ (Fas-рецепторів) на лімфоцитах ($23,6 \pm 0,42\%$ при нормі $17,9 \pm 0,33\%$), який вважається головним у реалізації апоптозу активованих Т-лімфоцитів. Відомо, що CD95⁺ не експресується на Т-клітинах, що знаходяться у стані спокою, і слабо експресується на В-лімфоцитах. При активації CD95⁺ експресується на нейтрофілах, активних Т-лімфоцитах, які характеризуються високою чутливістю до Fas-індукованого апоптозу [7].

Показники клітинного імунітету та апоптозу у хворих на ХОЗЛ				Таблиця
Показник	Контрольна група (n=24)	Хворі на ХОЗЛ (n=65)	p	
CD3 ⁺ , %	66,4 ± 0,59	57,5 ± 0,6	< 0,001	
CD22 ⁺ , %	13,6 ± 0,3	19,8 ± 0,3	< 0,001	
0-лімфоцити, %	20,2 ± 0,7	22,7 ± 0,7	< 0,01	
CD4 ⁺ , %	37,3 ± 0,37	29,2 ± 0,3	< 0,001	
CD8 ⁺ , %	28,6 ± 0,38	28,3 ± 0,4	–	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,3 ± 0,02	1,03 ± 0,02	< 0,001	
Маркери апоптозу на лімфоцитах				
HLA-ABC, %	16,6 ± 0,5	21,8 ± 0,62	< 0,001	
HLA-DR, %	12,4 ± 0,41	19,1 ± 0,37	< 0,001	
CD95 ⁺ , %	15,9 ± 1,04	23,6 ± 0,42	< 0,001	
p53, %	13,7 ± 0,84	15,2 ± 0,65	≤ 0,2	
CD95 ⁺ /CD3 ⁺	0,27 ± 0,006	0,41 ± 0,01	< 0,001	
Маркери апоптозу на нейтрофілах				
HLA-ABC, %	22,3 ± 1,58	24,03 ± 0,6	–	
HLA-DR, %	18,4 ± 0,94	21,38 ± 0,7	< 0,05	
CD95 ⁺ , %	19,0 ± 0,64	25,7 ± 0,7	< 0,001	
p53, %	18,1 ± 0,89	22,2 ± 0,95	< 0,01	
Інтенсивність апоптозу спонтанна, %	21,9 ± 0,77	19,7 ± 0,55	< 0,05	
Інтенсивність апоптозу індукована, %	28,4 ± 0,82	27,1 ± 0,72	–	

Примітка: p — достовірність різниці показників у хворих та осіб із контрольної групи.

У обстежених хворих на ХОЗЛ кількість лімфоцитів, що експресують основний маркер апоптозу CD95⁺, достовірно перевищувала нормальні значення і характеризувала ризик розвитку вторинного імунного дефіциту за рахунок зменшення найважливішого пулу циркулюючих у крові лімфоцитів — зрілих Т-клітин. Зростання експресії CD95⁺ корелює зі зменшенням вмісту загальних Т-лімфоцитів, хелперів-індукторів і пояснює достовірне зниження в обстежених хворих кількості лімфоцитів з фенотипом CD3⁺ і CD4⁺. Ймовірно, послаблення експресії молекул CD3⁺ і CD4⁺ є одним із проявів апоптозу Т-клітин і вказує на підвищену чутливість до нього Т-лімфоцитів. Водночас В-лімфоцити виявилися більш стійкими, про що свідчить достовірне підвищення кількості CD22⁺-клітин у хворих на ХОЗЛ. Дані зміни поєднувалися із ростом індексу апоптозу Т-лімфоцитів CD95⁺/CD3⁺ (0,41±0,008 при нормі 0,26±0,006), що характеризує в сукупності ризик розвитку вторинного імунного дефіциту.

Однак рівень експресії Fas відображає лише готовність клітини до апоптозу, але не є вирішальним його фактором [7]. Досліджено, що тривалість життя лімфоцитів залежить не тільки від класичних рецепторів клітинної смерті (CD95⁺). Відомо, що молекули головного комплексу гістосумісності (HLA) I та II класів, що беруть участь у сигнальній трансдукції в Т- та В-клітинах, можуть одночасно функціонувати і як рецептори, що передають апоптичний чи проліферативний сигнали. Апоптоз, опосередкований молекулами HLA-ABC і HLA-DR, є каспазонезалежним і не залежить від Fas/CD95⁺. Беручи участь у сигнальній трансдукції, молекули HLA забезпечують тим самим апоптоз ранніх типів антигенпрезентуючих клітин [5]. В обстежених хворих на ХОЗЛ було виявлено достовірне підвищення експресії маркерів HLA-ABC і HLA-DR на лімфоцитах, що підтверджує їх готовність до апоптозу.

У механізмах індукції процесу апоптозу важливе значення має накопичення внутрішньоклітинного

проапоптозного білка p53. P53-залежний шлях апоптозу реалізується у відповідь на ушкодження генома, дію цитотоксичних агентів, вплив активних форм кисню, пероксинітриту [10]. Білок p53 постійно синтезується клітинами, але швидко розщеплюється, тому концентрація його у більшості нормальних клітин дуже низька [1]. Накопичення білка p53 призводить до зупинки мітотичного циклу, а при неможливості репарації ДНК — до апоптозу. В обстежених хворих встановлено слабку тенденцію до підвищення експресії цього білка порівняно з групою здорових осіб (15,2±0,65% при нормі 13,7±0,84%), що також є фактором, який підтверджує активацію апоптичних процесів лімфоцитів.

Отже, при аналізі результатів дослідження, що характеризують проапоптичні процеси у лімфоцитах хворих на ХОЗЛ, виявлено активацію апоптозу лімфоцитів, який реалізується різними патогенетичними шляхами. Активация програмованої смерті лімфоцитів сприяє розвитку і/або підтриманню та прогресуванню Т-імунодефіциту, зумовлює порушення співвідношення основних субпопуляцій Т-лімфоцитів при даній патології, що, у свою чергу, сприяє підтриманню і прогресуванню запального процесу в організмі та ХОЗЛ як захворювання.

Дослідження проапоптозних маркерів на нейтрофілах виявили неоднозначний характер змін досліджуваних показників. Експресія CD95⁺ та вміст проапоптичного білка p53 на нейтрофілах були підвищеними. Однак експресія молекул HLA-ABC на нейтрофілах не відрізнялася від норми, а експресія HLA-DR — дещо посилювалася.

Водночас при морфологічній оцінці інтенсивності спонтанного апоптозу нейтрофілів встановлено достовірне його зниження у більшості обстежених пацієнтів (19,7±0,55% проти 21,9±0,77%), що може бути фактором, який підтримує нейтрофільне запалення у бронхіальному дереві, а інтенсивність індукованого аутосірваткою апоптозу суттєво не відрізнялася від рівня у практично здорових осіб.

Наявність значущих порушень процесів програмованої смерті імуноткомпетентних клітин може вважатися ранньою ознакою формування імунопатологічного стану. Різноступеневі зміни певних показників апоптозу нейтрофілів свідчать про неоднозначність виявлених процесів. З одного боку, активація мікрофагів є необхідним елементом протиінфекційного захисту, а підвищена чутливість нейтрофілів до проапоптичних факторів зумовлена їх коротким життєвим циклом. З іншого боку, відсутність підвищеної експресії HLA-ABC та зниження інтенсивності спонтанного апоптозу нейтрофілів є факторами, які підтримують нейтрофільне запалення при ХОЗЛ. Підтримання запального процесу сприяє також викид із нейтрофілів великої кількості ферментів та інших біологічно-активних речовин, який спостерігається при знищенні ними чужорідних клітин у вогнищі запалення [6].

Отже, у хворих на ХОЗЛ різного ступеня тяжкості встановлено посилення апоптичних процесів лімфоцитів, що зумовлює розвиток і підтримання Т-імунodefіциту, а виявлені зміни стану нейтрофілів можуть сприяти ослабленню їх захисних властивостей і створювати сприятливі умови для підтримання нейтрофільного запалення. Отримані дані дозволяють уточнити особливості апоптозу лімфоцитів та нейтрофілів периферичної крові у хворих на ХОЗЛ і встановити зв'язок порушень апоптозу з характеристикою запального процесу, що може визначати патогенетичну значимість порушень апоптозу в персистенції хронічного запалення.

Висновки

1. У хворих на ХОЗЛ різного ступеня тяжкості виявлено активацію процесів апоптозу лімфоцитів, який реалізується різними патогенетичними шляхами, зумовлює розвиток і підтримання вторинного Т-імунodefіциту з дисбалансом основних субпопуляцій Т-лімфоцитів і сприяє підтриманню імунопатологічного процесу в організмі.

2. Виявлені дискордантні зміни показників, що характеризують активацію і апоптоз нейтрофілів, зумовлюють підтримання нейтрофільного запалення в бронхолегеневій системі і сприяють прогресуванню ХОЗЛ в цілому.

Література

1. Васильева, И. А. Особенности сывороточного содержания sFas и p53 у женщин в пременопаузальном и постменопаузальном периодах [Текст] / И. А. Васильева, Н. Ю. Сотникова, И. К. Богатова, Е. А. Букина // Аллергология и иммунология. — 2009. — Т. 10, № 2. — С. 259.
2. Вяльцева, В. Ю. Роль апоптозу при інфекційних хворобах [Текст] / В. Ю. Вяльцева // Інфекційні хвороби. — 2007. — № 1. — С. 57–63.
3. Лыньська, І. Ф. Апоптоз нейтрофілоцитів та його роль в патогенезі запальних процесів в легенях туберкульозного та неспецифічного генезу [Текст] / І. Ф. Лыньська [та ін.] // Укр. пульмон. журн. — 2007. — № 2. — С. 32–38.
4. Кадан, Л. П. Спосіб визначення апоптозу нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові [Текст] / Л. П. Кадан, О. А. Підгайна, Л. В. Ареф'єва, А. С. Фірсова // Лабор. діагностика. — 2005. — № 3 (33). — С. 49–52.
5. Кайдашев, И. П. Проявление резистентности к апоптозу, индуцированному связыванием CD95 (FAS) и молекул HLA I и HLA

II классов, мононуклеарными клетками периферической крови больных atopической бронхиальной астмой [Текст] / И. П. Кайдашев [и др.] // Иммунология. — 2006. — № 1. — С. 13–18.

6. Понякина, И. Д. Активация апоптоза нейтрофилов периферической крови как показатель аутоинтоксикации организма [Текст] / И. Д. Понякина // Клини. лаб. диагностика. — 2003. — № 7. — С. 19–21.

7. Сурнакова, Н. Е. Поверхностный рецептор CD95 (Fas/APO-1), содержащий домен смерти, — новая мишень для лечения пациентов с ревматическими пороками сердца [Текст] / Н. Е. Сурнакова, Е. В. Ткаченко // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 155–158.

8. Ушкварок, Л. Б. Влияние ингибиторов ангиотензина и его фермента на механизмы развития апоптоза при ХСН [Текст] / Л. Б. Ушкварок // Укр. терапевт. журн. — 2006. — № 2. — С. 43–46.

9. Фільченков, О. О. Апоптоз і рак: від теорії до практики / О. О. Фільченков, Р. С. Стойка. — Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. — 524 с.

10. Хухліна, О. С. Інтенсивність процесів апоптозу та проліферації гепатоцитів при неалкогольному стеатозі печінки і стеатогепатиті хворих на цукровий діабет II типу [Текст] / О. С. Хухліна, І. С. Давиденко // Сучасна гастроентерологія. — 2005. — № 3. — С. 26–30.

11. Demedts, Inge K. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema [електронний ресурс] / Inge K. Demedts, T. Demoor, K. R. Braske et al. // Respir. Res. — 2006. — Vol. 7. — Режим доступу: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1501017/>

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА НА ЛИМФОЦИТАХ И НЕЙТРОФИЛАХ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

О.И. Лемко, Н.В. Вантюх, М.И. Попадинец

Резюме. У больных хронической обструктивной болезнью легких обнаружено активацию процессов апоптоза лимфоцитов и дискордантные изменения показателей апоптоза нейтрофилов, что способствует развитию вторичной иммунной недостаточности и поддержанию нейтрофильного воспаления в бронхолегочной системе.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, апоптоз.

THE EXPRESSION OF APOPTOSIS' MARKERS ON LYMPHOCYTES AND NEUTROPHYLLS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

O.I. Lemko, N.V. Vanyukh, M.I. Popadinets

Summary. The activation of lymphocytes' apoptosis and discordant changes of neutrophylls' apoptosis data were detected in COPD patients. This disturbances promote the development of secondary immune deficiency and maintain neutrophyll's inflammation in bronchi and lungs.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, apoptosis.