

О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, К. Ф. Чернушенко, А. С. Фірсова ВПЛИВ ДЕКСАМЕТАЗОНУ IN VITRO НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України

Імунітет як система захисту організму від генетично чужорідного субстрату формується та функціонує під впливом різних регуляторних факторів, серед яких важливу роль відіграє ендокринна система. Гормони контролюють основні функції клітин організму, в тому числі і такі важливі прояви життєдіяльності клітин, як проліферація та апоптоз. Відомо, що саме баланс між загибеллю (в тому числі і шляхом апоптозу) та проліферацією клітин визначає клітинний гомеостаз організму [8]. Співвідношення цих двох форм відповіді — проліферації лімфоцитів і апоптозу — є важливим параметром реактивності імунної системи. Це співвідношення змінюється при патології, що може стати об'єктом направленої впливу за допомогою імуномодуючих засобів [1].

В терапії захворювань легень широко застосовуються глюкокортикоїди (ГК) [6, 7]. Дія їх специфічна і опосередковується через глюкокортикоїдні рецептори, які знаходяться на поверхні клітин. За даними останніх досліджень показано, що деякі субпопуляції дозрілих лімфоцитів піддаються апоптозу під впливом ГК [2]. Одним із ефектів цих гормонів є спроможність стимулювати синтез антиапоптичних білків в нейтрофільних гранулоцитах (НГ), індукувати апоптоз клітин, які інфільтрують бронхіальне дерево при запальних процесах, супресувати Fas-індукований апоптоз НГ [2]. Вивчення апоптогенних властивостей ГК сприятиме уточненню показань до їх призначення.

У зв'язку з цим метою даного дослідження було вивчення in vitro впливу дексаметазону на апоптичну та проліферативну активність лімфоцитів (Лф), їх співвідношення, а також інтенсивність апоптозу нейтрофільних гранулоцитів.

Матеріали та методи

Обстежено 34 хворих на туберкульоз легень, які проходили стаціонарне лікування у відділенні фтизіатрії інституту, та 10 здорових осіб — донорів крові. Переважну більшість обстежених становили особи у віці 18–40 років. У пацієнтів переважала інфільтративна форма туберкульозу легень — 26 (76,4 %) хворих. Дисемінований туберкульоз діагностований у 8 (23,6 %) хворих. У всіх пацієнтів до початку лікування активність процесу була підтверджена даними клініко-рентгенологічного і лабораторного досліджень. Мікобактерії туберкульозу (МБТ) були виявлені у переважної більшості хворих — у 30 пацієнтів (88,2 %).

Відомо, що зрілі лімфоцити стійкі до апоптозу. Попередня їх активація сприяє "придбанню чутливості" до апоптогенних стимулів, і тому вплив препарату на інтенсивність апоптозу було досліджено на попередньо активованих клітинах (активаційний апоптоз Лф).

Зважаючи на те, що процеси проліферації та апоптозу лімфоцитів в організмі відбуваються одночасно, вивчали вплив дексаметазону (ДМЗ) (фірма "KRKA") на інтенсивність активаційного апоптозу та проліферативну активність цих клітин, їх співвідношення. Для надання ак-

тиваційного стимулу мононуклеарам периферичної крові використовували неспецифічний мітоген ФГА (10 мкг/мл). На висоті активації клітин (3 доба) в поживне середовище додавали ДМЗ в дозі 1×10^{-3} мг/мл та продовжували інкубацію клітин ще 48 годин. Підготовлювали препарати для обліку кількості апоптичних лімфоцитів (підраховували кількість клітин з фрагментованими ядрами [5] після фарбування барвником Hoechst 33342 (Sigma, США) на флюоресцентному мікроскопі) та числа проліферуючих лімфоцитів (методом світлової мікроскопії підраховували кількість лімфобластів [4]).

Для вивчення впливу препарату на інтенсивність спонтанного апоптозу нейтрофільних гранулоцитів (НГ) було використано методику Н. А. Маянського [3]. Застосовували ДМЗ в дозі 1×10^{-3} мг/мл. Підрахування відсотку клітин з характерними морфологічними ознаками апоптозу (конденсація цитоплазми, хроматину та пікноз ядер) проводили методом світлової мікроскопії. Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента за допомогою програмного продукту Microsoft® ExcelTM 2000.

Результати

Вплив дексаметазону на інтенсивність апоптозу лімфоцитів та їх проліферативну активність було вивчено у 26 хворих на туберкульоз легень. Встановлено, що рівень активаційного апоптозу у пацієнтів ($19,8 \pm 1,7$ %) вірогідно вищий, ніж у здорових осіб ($9,5 \pm 1,3$ %). Проліферативна активність лімфоцитів обстежених хворих була значно нижча, ніж в контрольній групі здорових осіб ($44,7 \pm 3,0$ %) та ($62,5 \pm 2,0$ %) відповідно, $P < 0,05$).

Додання в інкубаційне середовище дексаметазону знижувало рівень активаційного апоптозу Лф у хворих на туберкульоз легень ($15,2 \pm 1,5$ %), $P < 0,05$) та стимулювало апоптичну активність лімфоцитів здорових осіб ($21,6 \pm 1,8$ %), $P < 0,05$), пригнічувало проліферацію лімфоїдних клітин як у хворих ($9,5 \pm 1,3$ %), так і у здорових ($20,4 \pm 1,6$ %), $P < 0,05$). Направленість впливу ДМЗ не залежала від початкового рівня проліферації лімфоцитів обстежених пацієнтів: як при зниженій функціональній активності лімфоцитів ($36,6 \pm 2,5$ %), так і при нормальній ($63,8 \pm 1,6$ %), дексаметазон викликав вірогідне її пригнічення ($7,4 \pm 1,7$ %) та ($11,7 \pm 4,10$ % відповідно, $P < 0,05$).

З'ясовано, що співвідношення апоптичної та проліферативної активності клітин здорових осіб дорівнювало ($0,15 \pm 0,02$) у.о. та змінювалось під впливом дексаметазону за рахунок активації апоптичної активності Лф та пригнічення їх проліферації і складало ($1,06 \pm 0,10$) у.о. У хворих на туберкульоз легень це співвідношення суттєво відрізнялось від контролю і становило ($0,49 \pm 0,10$) у.о. Зміна співвідношення відбувалася за рахунок більш високої інтенсивності апоптозу лімфоцитів хворих та зниження їх функціональної активності. Дексаметазон пригнічував як апоптичну, так і переважно проліферативну активність клітин ($3,2 \pm 0,7$) у.о.

За співвідношенням інтенсивності апоптозу та проліферативної активності лімфоїдних клітин (САП) хворі були

розподілені на наступні групи: до I були віднесені 12 хворих (44,4 %) з підвищеною апоптичною активністю Лф та зниженою проліферативною; до II — 6 (22,2 %) пацієнтів з нормальною інтенсивністю апоптозу і зниженою проліферативною активністю; III групу склали 6 осіб (22,2 %) з підвищеним апоптозом та нормальною проліферативною активністю лімфоцитів; до IV були віднесені 3 пацієнта (11,2 %) з нормальними показниками інтенсивності апоптозу і проліферації клітин.

ДМЗ у всіх пацієнтів I групи призводив до вірогідного пригнічення проліферативної активності лімфоцитів ($(39,1 \pm 3,3) \%$ та $(7,6 \pm 2,5) \%$ відповідно, $P < 0,05$). У 9 пацієнтів I групи (75,0 %) спостерігалась інтенсивна загибель клітин шляхом апоптозу, САП складало $(0,8 \pm 0,1)$ у.о. Додання ДМЗ в культуральне середовище клітин призводило до зниження інтенсивності активаційного апоптозу Лф цих хворих (табл. 1) та зміни САП до $(3,8 \pm 0,7)$ у.о. У 3 осіб цієї групи (25,0 %) препарат не впливав на підвищений рівень апоптозу, тобто САП змінювався за рахунок пригнічення тільки проліферації клітин ($(0,38 \pm 0,04)$ у.о та $(2,6 \pm 1,5)$ у.о., відповідно).

У всіх пацієнтів II групи препарат також пригнічував бластоутворення Лф ($(30,7 \pm 2,7) \%$ та $(7,1 \pm 1,7) \%$ відповідно, $P < 0,05$). У 3 пацієнтів цієї групи (50,0 %) додання ДМЗ у культуральне середовище призводило до подальшого пригнічення інтенсивності апоптозу клітин (табл. 1) і суттєво не впливало на САП ($(0,3 \pm 0,1)$ у.о та $(0,7 \pm 0,2)$ у.о., відповідно). У 2 хворих (25,0 %) спостерігалась значна стимуляція апоптозу, САП змінювався тільки за рахунок пригнічення функціональної активності Лф ($(0,4 \pm 0,1)$ у.о. та $(3,1 \pm 1,1)$ у.о. відповідно). У одного пацієнта змін не відбувалося.

У всіх пацієнтів III групи виявлено зниження проліферативної активності клітин ($(61,3 \pm 1,4) \%$ та $(15,3 \pm 6,9) \%$ відповідно, $P < 0,05$) під впливом ДМЗ. У 3 хворих (60,0 %) дексаметазон зменшував також і надмірну активність апоп-

тозу Лф, що змінювало САП ($(0,4 \pm 0,05)$ у.о. та $(1,4 \pm 1,2)$ у. о., відповідно). У 2 осіб (40,0 %) спостерігалась активація апоптозу (табл. 1) та зміна САП за рахунок одночасного пригнічення проліферативної активності клітин ($(0,3 \pm 0,01)$ у.о та $(2,0 \pm 0,8)$ у.о. відповідно).

У пацієнтів IV групи ДМЗ не впливав на інтенсивність апоптозу Лф (табл. 1) та пригнічував проліферацію ($(68,5 \pm 2,7) \%$ та $(13,2 \pm 5,8) \%$ відповідно, $P < 0,05$), що призвело до суттєвої зміни співвідношення цих двох процесів ($(0,10 \pm 0,03)$ у.о. та $(2,5 \pm 1,8)$ у.о. відповідно).

Вивчення впливу дексаметазону на апоптичну активність нейтрофільних гранулоцитів було проведено у 34 хворих на туберкульоз легень. Встановлено, що в загальній групі обстежених початковий рівень спонтанного апоптозу НГ вірогідно нижчий ($9,3 \pm 0,9) \%$, ніж у здорових осіб ($16,3 \pm 1,8) \%$. Стимулюючий ефект дексаметазону спостерігався у 12 (35,2 %) хворих, пригнічуючий — у 11 (32,4 %) пацієнтів та у 32,4 % випадків він не впливав на інтенсивність апоптозу НГ.

В залежності від початкового рівня спонтанного апоптозу НГ обстежені хворі були розподілені на 3 групи: I групу склали 21 (61,7 %) пацієнт зі зниженим його рівнем, II — 8 (23,6 %) хворих з підвищеним та III — 5 осіб (14,7 %) з нормальною апоптичною активністю НГ.

У 6 пацієнтів (28,6 %) I групи ДМЗ вірогідно підвищував інтенсивність апоптозу НГ (табл. 2). У 8 осіб (38,1 %) спостерігалась пригнічуюча дія і у 7 хворих (33,3 %) препарат не впливав на рівень апоптозу НГ.

У 4 хворих II групи (50,0 %) відмічався стимулюючий ефект препарату, у 1 пацієнта (12,5 %) — пригнічуючий та у 3 (37,5 %) ДМЗ не викликав змін інтенсивності апоптозу НГ.

Серед пацієнтів з нормальним рівнем спонтанного апоптозу НГ (Ш група) препарат у 2 осіб підвищував інтенсивність апоптозу, у одного хворого пригнічував та у 1 — не впливав на цей показник.

Таблиця 1

Вплив дексаметазону *in vitro* на інтенсивність активаційного апоптозу лімфоцитів (М т)

Групи обстежених	n	Пригнічення			Стимуляція			Без змін		
		n	ФГА	ФГА+ДМЗ	n	ФГА	ФГА+ДМЗ	n	ФГА	ФГА+ДМЗ
I	12	9	$26,4 \pm 2,5$	$13,2 \pm 2,0^*$	—	—	—	3	$18,7 \pm 2,7$	$17,7 \pm 1,9$
II	6	3	$9,3 \pm 1,8$	$4,7 \pm 0,3^*$	2	11,5	29,5	1	9,0	8,0
III	5	3	$21,7 \pm 1,4$	$13,6 \pm 3,0^*$	2	38,0	53,0	—	—	—
IV	3	—	—	—	—	—	—	3	$9,7 \pm 1,9$	$7,7 \pm 1,6$

Примітка: * — зміна показника під дією дексаметазону вірогідна, $P < 0,05$.

Таблиця 2

Вплив дексаметазону на інтенсивність апоптозу НГ в залежності від його початкового рівню (М т)

Групи обстежених	n	Стимуляція			Пригнічення			Без змін		
		n	сп.ап НГ	ДМЗ	n	сп.ап. НГ	ДМЗ	n	сп.ап. НГ	ДМЗ
I	21	6	$8,1 \pm 1,1$	$17,8 \pm 2,1^*$	2	$6,5 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,5^*$	13	$5,9 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,4$
II	8	4	$27,9 \pm 1,8$	$39,0 \pm 4,2^*$	1	21,5	12,4	3	$23,3 \pm 1,7$	$23,2 \pm 2,1$
Ш	5	2	$17,0 \pm 0,1$	$25,8 \pm 4,2^*$	2	$16,5 \pm 0,1$	$9,8 \pm 1,2^*$	1	14,0	13,0

Примітка: * — зміна показника під дією дексаметазону вірогідна, $P < 0,05$.

Висновки

1. У здорових осіб дексаметазон *in vitro* підвищує інтенсивність апоптозу лімфоцитів периферичної крові та пригнічує їх проліферативну активність.

2. Лімфоцити хворих на туберкульоз легень виявляють різну чутливість до дії глюкокортикоїдів *in vitro*. У 57,7 % хворих дексаметазон викликає зниження інтенсивності апоптозу лімфоцитів, у 15,4 % — призводить до стимуляції та у 26,9 % хворих лімфоцити не чутливі до апоптогенної дії цього препарату.

3. У хворих на туберкульоз легень дексаметазон *in vitro* пригнічує проліферативну активність лімфоцитів

4. У переважної кількості хворих на туберкульоз легень дексаметазон *in vitro* суттєво порушує співвідношення апоптичної та проліферативної активності лімфоцитів за рахунок пригнічення апоптичної та, особливо, проліферативної активності клітин.

5. Зниження під дією дексаметазону інтенсивності апоптозу функціонально неповноцінних лімфоїдних клітин хворих на туберкульоз легень може сприяти їх тривалій циркуляції в організмі.

6. Вплив дексаметазону на інтенсивність апоптозу нейтрофільних гранулоцитів *in vitro* різнонаправлений і не залежить від початкового рівню апоптичної активності клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию* / М. Ф. Никонова, М. М. Литвина, М. И. Варфоломеева и др. // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 20–23.
2. *Бойчук С. В., Мустафин И. Г., Фассахов Р. С.* Механизмы дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов при atopической бронхиальной астме // Пульмонология. — 2003. — № 2. — С. 10–16.
3. *Маянский Н. А., Заславская М. И., Маянский А. Н.* Апоптоз эскулативных нейтрофилов человека // Иммунология. — 2000. — № 2. — С. 11–13.
4. *Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендации* / Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии. — Киев, 1988. — 18 с.
5. *CDW-150 associates with Src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis* / S. V. Muhalap, A. G. Berdova, C. L. Law et al. // J. Immunol. — 1999. — V. 162. — P. 5727.
6. *Irwin R. S., Madison J. M.* Systemic Corticosteroids for Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // The

New England Journal of Medicine. — 2003. — V. 348, N 26. — P. 2679–2681.

7. *Outpatient Oral Prednisone after Emergency Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* / S. D. Aaron, K. I. Vandermeulen, P. Hebert et al. // The New England Journal of Medicine. 2003. — V. 348, N 26. — P. 2683–2688.
8. *Graham A., Rook W.* Glucocorticoids and immune function // Baillieres Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism. — 1999. — V. 13, N 4. — P. 567–581.

ВПЛИВ ДЕКСАМЕТАЗОНУ IN VITRO НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

**О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан,
К. Ф. Чернушенко, А. С. Фірсова**

Резюме

Представлені дані вивчення *in vitro* впливу дексаметазону на апоптичну, проліферативну активність лімфоцитів та їх співвідношення, інтенсивність апоптозу нейтрофільних гранулоцитів у 34 хворих на туберкульоз легень. Встановлена різна чутливість імунокомпетентних клітин до дії глюкокортикоїдів *in vitro*. У переважної кількості хворих дексаметазон *in vitro* знижує інтенсивність апоптозу та пригнічує проліферативну активність лімфоцитів, суттєво порушує співвідношення цих процесів. Вплив дексаметазону на інтенсивність апоптозу нейтрофільних гранулоцитів *in vitro* різнонаправлений і не залежить від початкового рівня апоптичної активності клітин.

IN VITRO INFLUENCE OF DEXAMETHASON ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE IMMUNOCOMPETENT CELLS IN PATIENTS WITH LUNG TUBERCULOSIS

**O. R. Panasyukova, L. P. Kadan,
E. F. Chernushenko, A. S. Firsova**

Summary

The results of the *in vitro* studies of the influence of dexamethason on apoptotic and proliferative activity of lymphocytes and their ration, and the intensity of the neutrophilic granulocytes apoptosis in 34 patients with lung tuberculosis are presented. Different sensitivity of immunocompetent cells to the action of glucocorticoids *in vitro* has been determined. In most patients dexamethason reduced *in vitro* the intensity of apoptosis and suppressed proliferative activity of lymphocytes, substantially violating proportion of these processes. The *in vitro* influence of dexamethason on the intensity of apoptosis of neutrophilic granulocytes had different directions and did not depend on the initial level of the apoptotic activity of the cells.