

П. Р. Герич, М. М. Островський
ОСОБЛИВОСТІ СУБПОПУЛЯЦІЙНОГО СПЕКТРУ Т- І В-ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНЕ ОБСТРУКТИВНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Івано-Франківський державний медичний університет

Питання лікування, реабілітації і профілактики хворих із респіраторною патологією знаходяться в центрі уваги клінічної медицини і практичної охорони здоров'я. Захворювання органів дихання є найбільш поширеними хворобами людини і в структурі загальної захворюваності вони входять у число лідерів по кількості днів непрацездатності, інвалідизації населення, а серед причин смерті займають четверте місце, що, в свою чергу, призводить до значних економічних затрат на державному рівні [1].

Згідно із сучасними уявленнями хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) — це хронічне запальне захворювання бронхолегеневого апарату з переважним ураженням периферійних відділів респіраторної системи і розвитком емфіземи, що проявляється незворотною (або не повністю зворотною) бронхіальною обструкцією, має прогресуючий характер із розвитком легеневої недостатності і хронічного легеневого серця [2].

ХОЗЛ є найбільш поширеним захворюванням, адже вважають, що 11–13 % людей У загальній популяції уражені цією недугою, а захворюваність має тенденцію до подвоювання кожні п'ять років [2]. Станом на сьогодні в світі нараховується близько 600 мільйонів хворих на ХОЗЛ [3]. Згідно сучасних даних у нашій державі середня кількість уражених цією патологією складає 10–14 % від дорослого населення, а це близько 3 мільйонів людей [1, 7].

Враховуючи поширеність ХОЗЛ, за даними Національного інституту серця, легень та крові США, загальні витрати на лікування даної недуги тільки протягом одного року складають 23,9 мільярдів доларів [4]. Якщо скомбінувати розповсюдженість захворювання і витрати на нього, то у США на одну особу в середньому припадає 1522 долари на рік, що втричі перевищує аналогічний показник для бронхіальної астми, майже в 4 рази — пневмоній та більш ніж у 18 разів — туберкульозу [4].

Незважаючи на великі витрати, ХОЗЛ продовжує залишатися однією із головних причин смертності, посідаючи шосте місце серед всіх причин смертей населення Земної кулі [2]. Дослідження, які проведені в промислово розвинутих країнах, свідчать про подвоєння показників інвалідності та смертності кожні 10 років [5]. За прогнозами ВООЗ при збереженні темпу зростання цієї патології у 2020 році хронічні обструктивні захворювання легень займуть третє місце серед причин смертності населення [5, 6]. В "Європейській білій книзі легень" України представлена як одна з країн із найвищим рівнем смертності внаслідок ХОЗЛ серед чоловіків [3]. Так, зокрема, ріст смертності за 2004–2005 роки склав 0,8 % і становить 38,4 на 100 тисяч дорослого населення [7]. Слід заважити, що рівень внутрішньогоспітальної летальності внаслідок хронічного обструктивного захворювання легень залишається високим і складає 0,89 %, а це можна порівняти із таким при пневмоніях — 1,21 %, що

вказує на неблагополуччя як на стадії ранньої діагностики, базисної терапії, так і під час проведення стаціонарного лікування [7].

У рекомендаціях GOLD-2006 наводяться дані, які свідчать, що ризик захворювання пов'язаний, головним чином, із соціально-економічними причинами і низьким рівнем життя [2]. У майбутньому прогнозується збільшення поширення захворюваності, що зумовлюватиметься не тільки збільшенням кількості курців, але й ростом популяції і забрудненням довкілля [8].

Проте, незважаючи на велику кількість наукових досліджень, що торкаються проблеми ХОЗЛ, сучасне розуміння етапів формування і прогресування цієї патології залишається недостатньо вивченими [1–3]. Особливої уваги заслуговують розлади імунної відповіді, активності макрофагальних клітин на фоні патологічного метаболізму ліпідів клітинних мембран та оксидантного стресу, що створює передумови активації функціональних та незворотніх патогенетичних механізмів перебігу й прогресування ХОЗЛ [3, 9]. Вивченню стану імунної відповіді у хворих на ХОЗЛ присвячено багато робіт, проте, на нашу думку, розвиток імунних зрушень при даній патології залишається до кінця не розкритим, особливо на рівні функціональної активності макрофагів, субпопуляцій лімфоцитів периферійної крові та синтезу ними ряду трансмітерів запального процесу, а відтак і глобалізації системних проявів патології на рівні цілого людського організму.

Метою даного дослідження є оцінка стану субпопуляційного вмісту Т- і В-лімфоцитів периферійної крові хворих у фазі загострення хронічного обструктивного захворювання легень II стадії.

Матеріал та методи

Обстежено 56 хворих на ХОЗЛ II стадії. Верифікацію діагнозу та його формулювання проводили згідно матеріалів наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007р. "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія" [10]. Дослідження проводили до початку лікування із використанням загальноприйнятих схем терапії (згідно зі стандартами передбаченими Наказом МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р.) [10]. Контрольну групу порівняння склали 18 практично здорових осіб (ПЗО) без наявних ознак захворювань респіраторного тракту та іншої патології внутрішніх органів.

Для імунофенотипування субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів [CD3+, CD4+, CD8+, CD24+ (ІПО 24+), CD56+ (NK), CD150+ (ІПО 3+), ІПО47+ (HLA-DR+), CD95+ (Fas/APO-I)] з використанням моноклональних антитіл, дані клітини виділяли з периферійної крові за методом Л. Б. Хейфец, В. Ф. Абалкіна (1973). При цьому шприцом, промитим гепарином 1:5000, кров із ліктрової вени брали у хворого в кількості 5–7 мілілітрів, розводили в 2 рази ізотонічним розчином натрію хлориду і обережно по стінці пробірки нашаровували 5 мілілітрів розведеної крові на 3 мілілітри суміші фікол-верографіну ("Pharmacia", Швеція) (густина 1,076–1,078). Суміш центрифую-

гували протягом 30 хвилин при 400g, потім пастерівською піпеткою виділяли інтерфазний пласт, який складався з лімфоцитів. Отримані лімфоцити відмивали охолодженим (температура 4 °C) забуференим фосфатами (pH=7,2) фізіологічним розчином (ЗФР) шляхом центрифугування при 400 g тричі по 20, 10 і 10 хвилин відповідно. Після останнього центрифугування до осаду додавали невелику кількість ЗФР, ресуспензували та за допомогою трипанового синього проводили підрахунок кількості живих та мертвих клітин в камері Горяєва. Готували робочу концентрацію $4,0 \times 10^9$ клітин в 1 мілілітрі ЗФР. Реакцію виявлення антигенів клітин проводили за модифікованою методикою Е. Reinherz із співавт. (1997) на предметних скельцях, попередньо сумлінно відмитих та знежирених сумішшю Никифорова. Контури нанесення клітин обмежували плівкою Parafilm M, яку розплавляли на скельцях після нанесення отворів (діаметр — 5мм). У лунки заливали 0,01 % розчин полі-L-лізину (молекулярна вага 40–80 тисяч дальтон) в ЗФР, інкубували 45–60 хв. при температурі 37 °C, промивали у ЗФР. На скло з шаром полі-L-лізину наносили 0,05 мл виготовленої суспензії лімфоцитів. Клітини осаджувалися на склі у вологій камері протягом 20 хв. при температурі 37 °C, потім 30–40 хв. при температурі 4 °C. Після дворазового промивання скелець круговими рухами в ЗФР в лунки наносили 20 мкл моноклонових антитіл CD3, CD4, CD8, CD24, CD56 ("Sigma", США), ІПО-3, ІПО-4, ІПО-47 (Інститут онкології та патології ім. А. Кавецького АМН України), інкубували при 4 °C протягом 30 хв., промивали триразово в ЗФР. В лунки на 30 хв. при 4 °C наносили 50 мкл кон'югованих з ФІТЦ F(ab)2 фрагментів кролячої сироватки до імуноглобулінів миші ("Sigma", США).

Потім препарат тричі поспідовно промивали в охолоджену (температура 4 °C) ЗФР, висушували на повітрі, знімали плівку Parafilm M. Для попередження висихання препарату наносили краплю 50 % гліцерину, накривали покривним скельцем і краї покривного скельця запаювали розплавленим парафіном.

Препарати досліджували в люмінесцентному мікроскопі, оснащеному фазово-контрастним пристосуванням ("Люам-ІЗ"). Спочатку при фазовому контрасті підраховували загальну кількість клітин у полі зору, а потім ви-

раховували кількість клітин, що світяться, у спектрі збудження люмінесценції (порядок фільтрів: СЗ, С24, ФСІ, БС8). Враховували клітини, які мали кільцеве та точкове світіння. Відсоток лімфоцитів, що несуть на поверхні певний антиген, визначали після підрахунку ста клітин в препараті.

Результати та їх обговорення

Нами встановлено, що на час госпіталізації пацієнтів із ХОЗЛ II стадії у фазі загострення рівень CD56+ клітин у периферійній крові був на 18,9 % нижчим від показників у ПЗО ($p < 0,05$) (табл. 1). Також проведене дослідження показало, що у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень II стадії показники CD4+ клітин до початку лікування були достовірно понижені в 1,28 рази ($p < 0,05$) порівняно із даними групи порівняння (див. табл. 1). Рецептор CD-4 несуть клітини, описані як Т-лімфоцити з хелперними (індукторними) властивостями, до їх функції належить розпізнавання антигену, продукція лімфокінів та, як наслідок, запуск і регуляція всіх Т-клітинно-залежних імунних реакцій [11]. Власне тому, їх дефіцит при ХОЗЛ II стадії є переконливим свідченням дискоординації роботи імунної системи у даної когорті пацієнтів.

Показник CD8+ лімфоцитів периферійної крові на момент первинного обстеження в групі хворих із ХОЗЛ II стадії був збільшений в 1,24 рази і становив $(39,85 \pm 2,37) \%$, порівняно з показниками CD8+ клітин у ПЗО — $(32,12 \pm 2,15) \%$ ($p < 0,05$). Причому збільшення субпопуляції CD8+ лімфоцитів периферійної крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення корелює ($r = -0,89$; $p < 0,05$) із зменшенням вмісту CD4+ клітин. Отримані нами дані підтверджуються іншими науковцями, які констатують факт підвищення вмісту CD8+ клітин також й у біоптатах бронхів хворих на ХОЗЛ [8, 14]. На нашу думку, встановлені зміни зі сторони CD4+ та CD8+ лімфоцитів периферійної крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення є промінім свідченням порушення процесів лімфоцитарної кооперації в імунній відповіді в плані дисбалансу між клітинними та гуморальними реакціями. Ми цілком погоджуємось із твердженням Г. М. Дранніка (2006), К. Ф. Чернушенка (2007), що генерація, перебіг та прогресування багатьох захворювань, різноманітних за етіологією та патогенезом, у значній мірі залежать від стану імунної системи [12, 13]. Не виключенням із цього є й патологія органів дихання. Характер та інтенсивність імунних реакцій залежать від ступеня антигенного впливу, а також від функціонального стану різних ланок імунної системи [11]. Імунна відповідь здійснюється рядом клітинних популяцій: антигенпрезентуючі клітини (макрофаги, дендритні клітини лімфовузлів, ін.) передають інформацію про антиген Т-клітинам, які мають Т-клітинний рецептор (TCR), і В-клітинам з Ig-рецепторами [11–13]. Отриманий сигнал викликає активацію каскаду ферментних систем, які супроводжуються синтезом цитокінів — факторів росту в окремому специфічному клоні клітин [12, 13]. Т-лімфоцити в своєму складі мають дві регуляторні субпопуляції: Т-хелпери-ефектори (CD4) і кіллери-супресори (CD8), які визначають напрямок імунної відповіді на різні субстанції [9, 11], зміни кількісного складу яких нами власне й визначено у периферійній крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення.

За останні роки велику роль в регуляції імунної відповіді відводять двом основним типам Т-хелперних (CD4) клітин — Th-1 і Th-2. Антигени активують CD4-клітини і продукцію ІЛ-10, який сприяє перетворенню Th-0 в

Таблиця 1

Стан субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів (%) у периферійній крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення, (M±m)

Показник, %	ПЗО, n=18	Хронічне обструктивне захворювання легень II стадії, n=56
CD4+	47,26±2,74	37,14±2,41*
CD8+	32,12±2,15	39,85±2,37*
CD56+	18,31±1,18	14,85±1,21*
CD3+	68,45±3,87	67,65±3,24**
CD150+ (ІПО 3+)	8,62±0,72	6,54±0,35*
ІПО47+ (HLA-DR+)	11,18±0,87	15,08±1,22*
CD24+ (ІПО 24+)	13,34±0,72	12,45±1,05**
CD95+	7,62±0,72	12,16±0,58*

Примітки: вірогідність різниці показників між групами та контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p > 0,05$.

Th-1 [12]. Th-1 регулює інтенсивність клітинних реакцій, синтезуючи ІЛ-2, ІЛ-12, g-ІНФ, ФНП-а [11, 13]. Власне нами й виявлено чіткі зміни зі сторони кількісного вмісту активованих фракцій Т-лімфоцитів периферійної крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення, а саме — рівень ІПО47+ (HLA-DR+) клітин у дослідній групі був підвищений в 1,35 рази до $(15,08 \pm 1,22) \%$ ($p < 0,05$), порівняно із даними в контрольній групі ПЗО ($11,18 \pm 0,87 \%$). Проте, рівень загальних Т-лімфоцитів (CD3+) на момент первинного обстеження даного контингенту хворих не мав виражених несприятливих зсувів у порівнянні із показниками у ПЗО (див. табл. 1).

Другий тип (Th-2) синтезує цитокіни — ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-3, стимулює гуморальні реакції, сприяючи продукції В-клітинами імуноглобулінів [11-13]. У процесі аналізу результатів наших досліджень ідентифіковано достовірне зменшення в 1,32 рази ($p < 0,05$), порівняно із групою ПЗО, вмісту субпопуляцій активованих В-лімфоцитів (CD150+ (ІПО 3+)) у периферійній крові хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення (див. табл. 1), що ймовірно пояснюється їх надходженням у бронхоасоційовану лімфоїдну тканину з метою подальшого участі у гуморальних реакціях синтезу імуноглобулінів. Достовірних змін зі сторони субпопуляцій загальних В-лімфоцитів (CD24+ (ІПО 24+)) периферійної крові у хворих групи дослідження порівняно із контрольною групою нами не встановлено (див. табл. 1).

Різні вектори впливу Th-1 і Th-2 типів клітин — дуже важливий фактор регуляції, але оскільки вказані цитокіни можуть продукуватися і іншими клітинами, не можна стверджувати, що регуляція імунної відповіді здійснюється тільки цими типами хелперної популяції [12, 13].

Нами виявлено збільшення в 1,60 рази ($p < 0,05$) експресії CD95+ (Fas/APO-I) на лімфоцитах периферійної крові у хворих на ХОЗЛ II стадії у фазі загострення, порівняно із даними групи контролю, де даний показник склав $(7,62 \pm 0,72) \%$ (див. табл. 1). Враховуючи, що для Fas/Fas-L системи не відомо інших функцій, окрім активації апоптозу [11, 13], отримані результати вказують на наростання активації апоптозу лімфоцитів периферійної крові у досліджуваних хворих, що паралельно супроводжується зменшенням субпопуляційного вмісту активованих В-лімфоцитів та Т-хелперних клітин, на фоні наростання кількості Т-супресорів.

Перспективність подальших досліджень: полягає у візуалізації морфологічних змін стінки бронхів на клітинному й субклітинному рівнях та реєстрація змін локальних факторів захисту слизових оболонок дихальних шляхів, які б дозволили оцінити і співставити отримані нами дані стосовно динаміки субпопуляцій лімфоцитів крові в фазу загострення перебігу ХОЗЛ.

Висновки

Розвиток фази загострення ХОЗЛ II стадії проявляється зменшенням у периферійній крові хворих субпопуляційного вмісту Т-хелперів (CD4+) в 1,28 рази ($p < 0,05$), CD56+ (NK) в 1,23 рази ($p < 0,05$), активованих В-лімфоцитів (CD150+ (ІПО 3+)) в 1,32 рази ($p < 0,05$), при паралельному наростанні кількості Т-супресорів (CD8+) в 1,24 рази ($p < 0,05$), активованих Т-лімфоцитів (ІПО47+ (HLA-DR+) в 1,35 рази ($p < 0,05$) на фоні збільшення CD95+ лімфоцитів в 1,60 рази ($p < 0,05$) порівняно із практично здоровими особами.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Хроническое обструктивное заболевание легких: можно ли предотвратить проблему?* / Фещенко Ю. И., Яшина Л. А., Горюченко Н. Г. и др. // Здоров'я України. — 2006. — № 11–12. — С. 17–19.
2. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease* // Updated 2005 (based on an April 1998 NHLBI/WHO workshop). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2005; www.goldcopd.org.
3. *Фещенко Ю. І.* Хронічні обструктивні захворювання легень: проблемні питання // Нова медицина. — 2005. — № 1. — С. 18–20.
4. *Світовий тягар ХОЗЛ* // Медицина світу. — 2001. — Пульмонологія. — С. 34–38.
5. *Лещенко И. В., Эсаулова Н. А.* Основные положения международных клинических рекомендаций по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких // Пульмонология. — 2005. — № 3. — С. 101–111.
6. *Фещенко Ю. И.* Хронические обструктивные заболевания легких. — Киев: Книга, 2002. — 60 с.
7. *Порівняльні дані про розповсюдженість хвороб органів дихання і медичну допомогу хворим на хвороби пульмонологічного та алергологічного профілю в Україні за 2001-2005 р.р.* / АМН України. Центр медичної статистики. Ін-т фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського. — К., 2006. — 45 с.
8. *Палеев Н. Р.* Болезни органов дыхания // М.: Медицина, 2000. — 728 с.
9. *Чернушенко Е. Ф.* Актуальные проблемы иммунологии во фтизиатрии и пульмонологии // Матеріали III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України, Київ 25–28 травня 2003 р. // Укр. пульмонол. журн. — 2003. — № 2. — С. 94–95.
10. *Наказ МОЗ України № 128 від 19.03.2007* "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія".
11. *Roitt I.* Essential immunology. — Oxford: Blackwell Scientific Publicatione, 2001. — 438 p.
12. *Чернушенко Е. Ф.* Местный иммунитет: диагностика его нарушений и возможности коррекции // Мистецтво лікування. — 2007. — № 7(43). — С. 61–67.
13. *Дранник Г. Н.* Клиническая иммунология и аллергология: ООО "Полиграф плюс", 2006. — 600 с.
14. *Barnes J. Peter* Distribution of Receptor Targets in the Lung // The Proceedings of the American Thoracic Society. — 2004. — № 1. — P. 345–351.

ОСОБЛИВОСТІ СУБПОПУЛЯЦІЙНОГО СПЕКТРУ Т- І В-ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНЕ ОБСТРУКТИВНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

П. Р. Герич, М. М. Островський

Резюме

У роботі наведені дані щодо патогенетичних особливостей імунної відповіді в процесі генерації фази загострення хронічного обструктивного захворювання легень II стадії. Отримані результати свідчать про значну роль лімфоцитарних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів у процесах формування як локальних проявів, так і системних ефектах хронічного обструктивного захворювання легень.

PECULIARITIES OF SUBPOPULATION SPECTRUM OF T- AND B-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

P. R. Gerich, M. M. Ostrovskiy

Summary

The data concerning pathogenesis of immune response during exacerbation of stage II chronic obstructive pulmonary disease (COPD) have been presented. The results of the study demonstrated significant role of T- and B- lymphocyte subpopulations in the processes of both local and systemic manifestations of COPD.