

ВПЛИВ ПОЛІОКСИДОНІУ НА МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ У ПОЕДНАННІ ІЗ ВІСЦЕРАЛЬНИМ ОЖИРІННЯМ

Л.Н. Приступа, В.Ф. Орловський, Г.А. Фадєєва, В.В. Дитко
Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми

Встановлено зниження апоптозу лімфоцитів і нейтрофілів у хворих на бронхіальну астму у поєднанні із вісцеральним ожирінням порівнянно із хворими з нормальною масою тіла та нівелюючий вплив поліоксидоніу на виявлені порушення.

Апоптоз імунокомпетентних клітин (ІКК) є важливим механізмом патогенезу та персистенції алергічного запалення у хворих на бронхіальну астму (БА) та може визначати ступінь вираженості морфологічних та функціональних змін, ефективність лікування, прогноз [1,2,3]. Проведені численні дослідження з вивчення апоптозу лімфоцитів та еозинофілів у периферичній крові, біоптатах слизової оболонки бронхів та бронхоальвеолярного лаважу при БА [1,4]. Проте деякі із них мають суперечливий характер, що, ймовірно, пов'язано з різними методичними підходами до вивчення, а також – із неврахуванням супровідної патології у хворих. Відомо також, що у хворих із ожирінням спостерігається знижене число загальних Т-лімфоцитів, їх субпопуляцій за рахунок підвищення вмісту ФНП-а та його рецепторів, а зниження маси тіла сприяє ліквідації Т-клітинної дисфункції та зменшенню рівня ФНП-а [5]. У хворих на БА із зайвою масою тіла встановлено зниження спонтанного апоптозу лімфоцитів та експресії Fas-рецептора [2].

У літературі немає даних щодо особливостей апоптозу при асоціації БА і вісцерального ожиріння (ВО) та ефективності застосування поліоксидоніу (ПО), який є істинним імуномодулятором [6], і його впливу на апоптоз ІКК при даній асоціації захворювань.

Метою дослідження було порівняльне вивчення апоптозу лімфоцитів та нейтрофілів у хворих на БА та при її поєднанні із ВО і вплив на нього ПО.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Нами обстежено 72 хворих на БА, з них: 29 хворих на БА із нормальною масою тіла (І група) та 22 хворих на БА у поєднанні із ВО (ІІ група), які отримували загальноприйняте лікування; 21 хворий на БА у поєднанні із ВО, які отримували у доповнення ПО („Іммафарма”, Росія) по 6 мг дом’язово №10 (ІІІ група). Контрольну групу склали 22 практично здорових особи.

Визначення CD95⁺ проводили за допомогою моноклональних антитіл анти-CD95 (Україна), а виявлення апоптичних клітин - за допомогою барвника Hoechst 33342 (Sigma, США) непрямим імуофлуоресцентним методом. Клітини (%) з ознаками апоптозу (конденсація та фрагментація ядра) підраховували при збільшенні $\times 900$ у люмінесцентному мікроскопі “Люмам”. Отримані результати оброблені методом варіаційної статистики. Достовірність різниці середніх величин оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено підвищення вмісту апоптичних лімфоцитів у хворих І групи порівняно із контролем ($p < 0,05$) (табл. 1). У хворих ІІ і ІІІ груп вміст апоптичних лімфоцитів був зниженим порівняно із контролем та із

таким у I групі ($p < 0,05$). Феномен затримки апоптозу лімфоцитів є ключовим фактором патогенезу алергічного запалення, при якому порушений баланс між індукторами апоптозу та факторами, що сприяють виживанню клітин [4,7]. Виявлене сповільнення апоптозу лімфоцитів периферичної крові при поєднанні БА із ВО має важливе патогенетичне значення, оскільки може призводити до інфільтрації ними слизової оболонки бронхів із подальшим звільненням цитокінів, які здатні залучати до вогнища запалення різні клітини.

Після лікування у хворих I групи вміст апоптичних лімфоцитів залишався вищим за показник контролю ($p < 0,05$). Отримані нами дані про посилення апоптозу лімфоцитів у хворих на БА із НМТ при використанні глюкокортикостероїдів (ГКС) співзвучні із даними досліджень, у яких підтверджено, що вони індують фрагментацію ДНК більшою мірою у хворих на БА, ніж у здорових [8]. Це дозволяє пояснити нам високий рівень апоптозу лімфоцитів у хворих на БА із НМТ. Проте проапоптичний ефект ГКС стосовно лімфоцитів не був реалізованим у хворих на БА у поєднанні із ВО, у яких вміст апоптичних лімфоцитів зростав порівняно із вихідним рівнем, але залишався нижчим за показник контролю ($p < 0,05$) та за такий у I групі ($p < 0,05$), що може свідчити про превалювання антиапоптичних стимулів у даних пацієнтів. У хворих III групи рівень апоптичних лімфоцитів наближався до контрольного показника та був вищим за такий у хворих I групи ($p < 0,05$). Отже, наявність ВО сприяла збереженню вмісту апоптичних лімфоцитів на зниженому рівні, незважаючи на проведене лікування, а залучення ПО сприяло його підвищенню.

Виявлено зниження вмісту апоптичних нейтрофілів у пацієнтів усіх груп, що свідчить про їх подовжене виживання, особливо у пацієнтів II та III груп, у яких він був нижчим порівняно із контролем ($p < 0,05$) та із таким у I групі ($p < 0,05$). Ці дані демонструють негативний ефект наявності ВО у хворих на БА – їх антиапоптичну дію стосовно нейтрофілів. Після лікування у пацієнтів I групи рівень апоптичних нейтрофілів мав тенденцію до підвищення, у хворих II групи зростав порівняно із вихідним рівнем ($p < 0,05$), але залишався нижчим за показник контролю ($p < 0,05$). У хворих III групи вміст апоптичних нейтрофілів наближався до показника у контролі і був вищим за аналогічний показник у хворих I ($p < 0,05$) та II груп ($p < 0,05$). Отже, застосування ПО сприяло гальмуванню антиапоптичної дії ГКС стосовно нейтрофілів та посиленню їх апоптозу.

Рівень експресії маркера готовності до апоптозу на моноклеарах периферичної крові у хворих I групи не відрізнявся від контролю. Відсутність змін із боку експресії CD95⁺ на моноклеарах може бути пов'язана із зміною фенотипу циркулюючих Т-лімфоцитів. Оскільки показник числа CD95⁺-клітин у нефракціонованій суміші лімфоцитів найбільшою мірою відображає стан CD4⁺ субпопуляції Т-лімфоцитів, тому що клітин серед CD4⁺, що несуть Fas-рецептор, втричі більше, ніж серед CD8⁺, і у 2-3 рази більше, ніж серед В-лімфоцитів [3]. Рівень експресії CD95⁺ у хворих II ($p < 0,05$) та III груп ($p < 0,05$) був зниженим порівняно із контролем та із таким у хворих I групи ($p < 0,05$). Наприкінці лікування він не змінювався у хворих I групи, мав тенденцію до підвищення у хворих II групи та зростав у хворих III групи ($p < 0,05$).

Рівень експресії CD95⁺ на нейтрофілах також був зниженим у хворих усіх груп до початку лікування, причому у хворих II і III груп він був нижчим не лише порівняно із контролем ($p < 0,05$), а й із таким у хворих із НМТ ($p < 0,05$). Аналіз взаємозв'язку між апоптозом нейтрофілів та експресією ними CD95⁺ показав, що у міру зменшення числа апоптичних нейтрофілів зменшувалась експресія маркера готовності до апоптозу. Отже, можна робити висновок про те, що гальмування апоптозу

нейтрофілів при БА відбувається на рівні Fas-залежних механізмів, а міра його виразності залежить від маси тіла пацієнтів. Після лікування рівень експресії CD95⁺ на нейтрофілах залишався зниженим у хворих II групи і наближався до контролю у хворих III групи, перевищуючи при цьому аналогічний показник у хворих II групи (p<0,05).

Таблиця 1 – Дослідження вмісту апоптичних лімфоцитів і нейтрофілів

Показник, %	Контроль, n=22	I група, n=29	II група, n=22	III група, n=21
Апоптичні лімфоцити	8,3±0,61	<u>12,7±0,68*</u> 10,4±0,67**	<u>5,2±0,46* **</u> 6,5±0,42** ***	<u>5,3±0,49* **</u> 7,2±0,59** ***
Апоптичні нейтрофіли	7,9±0,12	<u>5,7±0,45*</u> 5,8±0,63*	<u>3,4±0,38* **</u> 5,3±0,49*	<u>3,4±0,32* **</u> 7,8±0,61** ***

Примітки:
 1 * Достовірність відмінності (p<0,05) показників порівняно із контролем.
 2 ** Достовірність відмінності (p<0,05) показників порівняно із I групою.
 3 *** Достовірність відмінності (p<0,05) показників до і після лікування.
 4 Чисельник – показники до лікування, знаменник – показники після лікування

Таблиця 2 – Рівень експресії маркера готовності до апоптозу

Показник, %	Контроль, n=22	I група, n=29	II група, n=22	III група, n=21
CD95 ⁺ - мононуклеари	30,7±2,67	<u>33,5±2,4</u> 6 32,8±2,6 4	<u>22,6±2,04* *</u> * 27,6±1,88	<u>21,9±1,09* **</u> 26,9±1,38**
CD95 ⁺ - нейтрофіли	9,3±1,78	<u>6,4±0,47</u> 7,8±0,69	<u>3,8±0,29* **</u> 5,5±0,49* **	<u>3,7±0,59* **</u> 7,3±0,57** ***

Примітки:
 1. * Достовірність (p<0,05) відмінності показників порівняно із контролем.
 2. ** Достовірність (p<0,05) відмінності показників порівняно із I групою.
 3. *** Достовірність (p<0,05) відмінності показників до і після лікуванн.
 4. Чисельник – показники до початку лікування; знаменник – після лікування

Таким чином, лікування із залученням ПО хворих на БА у поєднанні із ВО сприяло більш вираженому зростанню вмісту апоптичних лімфоцитів і нейтрофілів поряд із підвищенням експресії CD95⁺. Гіперекспресія CD95⁺ на поверхні лімфоцитів свідчить про підвищену готовність клітин до вступу в апоптоз за Fas-залежним шляхом, а знижений вміст CD95⁺ - про незавершеність процесу апоптозу, що пов'язаний із порушеннями його регуляції під дією екзогенних та ендогенних причин [8]. Згідно із результатами нашого дослідження підвищений вміст апоптичних лімфоцитів у хворих I групи не був пов'язаний із зростанням рівня експресії CD95⁺, що може свідчити про необов'язковість участі Fas-рецептора і про те, що існують інші

механізми запуску апоптозу у даних хворих. Поряд із цим зменшення вмісту апоптичних лімфоцитів у хворих на БА із ВО супроводжувалося зниженням експресії CD95⁺, що свідчить про порушення чутливості до апоптозу лімфоцитів та нейтрофілів на фоні ГКС-терапії у хворих із даною асоціацією захворювань, яке зумовлено зниженою активністю Fas-залежних механізмів. Очевидно, що зниження апоптозу даних клітин зумовлене наявністю ендогенних антиапоптичних чинників, що може бути зумовлене ендокринною функцією жирової тканини, яка продукує прозапальні цитокіни, що зумовлюють виникнення імунних розладів, запального системного процесу [9].

Таким чином, за наявності ВО у хворих на БА, незважаючи на приймання ГКС, зберігається на зниженому рівні апоптоз лімфоцитів, що узгоджується із низькою експресією CD95⁺. Проапоптичний ефект ГКС у даних хворих, очевидно, нівелювався іншими антиапоптичними стимулами. Подовжене виживання лімфоцитів у цих хворих може сприяти персистенції та прогресуванню алергічного запалення при БА і є однією із патогенетичних ланок обтяжливого впливу ВО на перебіг БА.

ВИСНОВКИ

1 Встановлено зниження апоптозу лімфоцитів і нейтрофілів при поєднанні БА та ВО, що супроводжувалося зниженою експресією CD95⁺.

2 Залучення ПО до комплексного лікування хворих на БА у поєднанні із ВО сприяло ліквідації виявлених зрушень з боку апоптозу, що є одним із механізмів реалізації позитивного клінічного ефекту ПО при даній асоціації захворювань.

Перспективним є подальше вивчення механізмів апоптозу з метою попередження і/чи ліквідації дії чинників, що призводять до його порушення.

SUMMARY

INFLUENCE OF POLYOXYDONIY ON APOPTOSIS IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS IN COMBINATION WITH VISCERAL OBESITY

*L.N. Prystupa, V.F. Orlovskiy, G. A. Fadeeva, V.V. Dytko
Sumy State University, Medical Institute*

A decreased apoptosis of lymphocytes and neutrophils in bronchial asthma patients in combination with visceral obesity was established. Leveling influence of polyoxydoniy on the revealed violations was revealed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Механизмы дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов при атопической бронхиальной астме // Пульмонология. – 2003. – №2. – С.10-16.
2. Царев В.П. Клинико-иммунологические особенности течения бронхиальной астмы больных с избыточной массой тела // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2002. – № 2. – С.73-85.
3. Differential expression of apoptosis – related Fas antigen on lymphocyte subpopulation in human peripheral blood / T. Miyawaki, R. Uehara, R. Nibu et al. // J. Immunol. – 1992. – Vol.149, №11. – P.3753-3758.
4. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma / A. Hamzaoui, K. Hamzaoui, H. Salah et al. //Mediators Inflamm.–1999. –Vol. 8, №4-5. – P. 237-243.
5. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF-alpha in human obesity: adequate weight reduction can be corrective / S. Tanaka, F. Isoda, V. Ishihara et al. // Clin. Endocrinol. – 2001. – Vol. 54, № 3. – P. 347-354.
6. Пинегин Б.В. Полиоксидоний – новое поколение иммуномодулятора с известной структурой и механизмом действия // Аллергия, астма и клин. иммунология. – 2000. – №1. – С.27- 28.

7. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis / A.M. Vignola, P. Chanez G. Chiappara et al. // J. Allergy Clin. Im.-1999.-Vol.103, №4.-P. 555-558.
8. Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Fas-рецептор и его роль при atopических заболеваниях // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 24-28.
9. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance / A.P. Kern, S. Ranganathan, C. Li et al. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2001. –Vol.280, №5. – P.745-751.

Приступа Л.Н., д-р мед. наук, професор, Медичний інститут СумДУ, м. Суми;

Орловський В.Ф., д-р мед. наук, професор, Медичний інститут СумДУ, м. Суми;

Фадєєва Г.А., Медичний інститут СумДУ, м. Суми;

Дитко В.В., Медичний інститут СумДУ, м. Суми

Надійшла до редакції 20 червня 2008 р.