

АПОПТОЗ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ ІЗ РІЗНОЮ МАСОЮ ТІЛА

Л.Н. Приступа, доц.

Сумський державний університет

ВСТУП

Численні проспективні дослідження показали невинне зростання поширеності ожиріння та чіткий зв'язок між збільшенням маси тіла та підвищенням ризику розвитку цілої низки захворювань, які на цей час об'єднують поняттям "метаболічний синдром" [1]. Проведені дослідження з вивчення взаємозв'язку ожиріння та бронхіальної астми (БА) надають зайвій масі тіла роль предиктора виникнення астми. Ожиріння асоціює із розвитком бронхіальної гіперреактивності, сприяє виникненню гастроезофагальної рефлюксної хвороби, порушень функції зовнішнього дихання, імунологічних розладів, що в кінцевому підсумку може призводити до виникнення БА [2,3,4]. Наявність взаємозв'язку між астмою та ожирінням підтверджено результатами його дієтичного, медикаментозного та хірургічного лікування, яке сприяло покращанню стану астматиків в усіх аспектах [5]. Зважаючи на наявність численних доказів взаємозв'язку ожиріння та БА виникає необхідність у подальших дослідженнях з вивчення ймовірних біологічних механізмів, які поєднують дані два захворювання. Одним із основних чинників виникнення БА на фоні ожиріння є біологічна активність жирової тканини, яка полягає у продукції прозапальних цитокінів, фактору інгібіції макрофагів, трансформуючого фактору росту, що може сприяти виникненню порушень у гуморальній та клітинній ланках імунітету, апоптозі клітин імунної системи [1]. Інтерес до апоптозу при БА обумовлений перш за все тим, що цей процес тісно пов'язаний із регуляцією імунної відповіді, розвитком імунодефіцитних станів, які мають патогенетичне значення при даному захворюванні. Крім того, фактори, що гальмують та індукують апоптоз, є ключовими у патогенезі БА (інтерлейкіни, інтерферони, глюкокортикостероїди, екстраклітинний матрикс) [6].

Апоптоз – це активна форма гибелі клітини, що є результатом реалізації її генетичної програми і потребує затрат енергії і синтезу білка. Морфологічно він проявляється зменшенням розмірів клітини, конденсацією та фрагментацією хроматину з подальшим розпадом клітини на оточені мембраною апоптичні тільця. У розвитку апоптозу виділяють 3 етапи: етап індукції, яка може бути викликана внутрішніми (пошкодження ДНК) чи зовнішніми (фактор некрозу пухлин, глюкокортикоїди, Fas-ліганд) факторами; етап передачі сигналу до розвитку апоптозу і ефекторний етап – деградація ДНК, зміна мембран і фрагментація клітини. Основна роль апоптозу полягає у підтриманні постійної кількості клітин, співвідношення різних клітинних субпопуляцій та елімінації дефектних клітин [7].

На сьогоднішній день проведені численні дослідження з вивчення апоптозу лімфоцитів та еозинофілів у периферичній крові, біоптатах слизової оболонки бронхів та бронхоальвеолярному лаважі при БА [8,9,10]. Дослідженнями Vignola A.M. (1999) встановлено зниження апоптозу еозинофілів та макрофагів у хворих на БА, а також обернену кореляцію між апоптозом даних клітин і важкістю клінічних проявів та експресією гранулоцитарно-макрофагально-

колонієстимулювального фактору (ГМ-КСФ). Подальшими дослідженнями виявлено, що підвищена кількість Т-лімфоцитів в астматиків тісно корелює з кількістю bcl-2 - клітин, які мають виражену антиапоптичну активність. Рівень bcl-2, у свою чергу, корелює із важкістю клінічних проявів та вмістом еозинофільного катіонного білка, який є маркером важкості перебігу БА [11, 12, 13]. Проте у деяких дослідженнях заперечується роль порушень апоптозу Т-лімфоцитів у формуванні хронічного запального процесу при БА [14]. Неоднозначність даних щодо участі апоптозу Т-лімфоцитів у патогенезі БА, очевидно, пов'язана з різними методичними підходами до вивчення даної проблеми і, у свою чергу, диктує необхідність подальших досліджень у цьому напрямку.

Практично не вивченим лишається апоптоз нейтрофільних гранулоцитів, з підвищеною активністю яких пов'язана гіперреактивність бронхів, дисбаланс у системі протеоліз-інгібітори і в кінцевому підсумку - розвиток пневмофіброзу та емфіземи [15].

МЕТА РОБОТИ

Порівняльне вивчення апоптозу лімфоцитів та нейтрофілів периферичної крові у хворих на БА з нормальною масою тіла та ожирінням.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Нами обстежено 32 хворих на важку гормонально залежну БА у фазі загострення, з них 14 хворих на БА, які мали нормальну масу тіла (I група); 18 хворих на БА у поєднанні із ожирінням (II група). Контрольну групу склали 10 практично здорових осіб без зайвої маси тіла. Індекс маси тіла (ІМТ) обчислювали шляхом ділення маси тіла (кг) на квадрат росту (м²). За нормальне значення ІМТ згідно з рекомендаціями ВООЗ брали його величину від 18 до 24,9, а за ожиріння – більшу за 30.

Суміш мононуклеарів отримували шляхом центрифугування гепаринізованої венозної крові у градієнті густини фікол-верографіну. Нейтрофіли виділяли із осаду, провівши лізис еритроцитів. Визначення CD95 проводили за допомогою моноклональних антитіл анти-CD95, виготовлених в інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького (м. Київ), непрямим імунофлуоресцентним методом. Виявлення апоптичних клітин проводили також непрямим варіантом імунофлуоресцентного методу за допомогою барвника Hoechst 33342 (Sigma, США). Клітини (%) з ознаками апоптозу (конденсація та фрагментація ядра) підраховували в люмінесцентному мікроскопі "Люам" при збільшенні $\times 900$.

Отримані результати оброблені методом варіаційної статистики. Достовірність різниці середніх величин оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження апоптозу лімфоцитів та нейтрофілів периферичної крові в обстежених групах наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Дослідження апоптозу клітин імунної системи у хворих на бронхіальну астму

Показник,%	Контроль	I група	II група
Вміст апоптичних лімфоцитів	8,3 \pm 0,61	12,4 \pm 0,98*	5,3 \pm 0,04***
Вміст апоптичних нейтрофілів	7,9 \pm 0,12	5,4 \pm 0,04*	3,1 \pm 0,02***

Примітка. * - достовірність відмінності ($p < 0,05$) у порівнянні із контролем; ** - достовірність відмінності у порівнянні між групами

Результати дослідження експресії маркера готовності до апоптозу (CD95) на нейтрофілах та мононуклеарах периферичної крові наведені у таблиці 2.

Таблиця 2 – Визначення маркера готовності до апоптозу (CD95) у хворих на бронхіальну астму

Показник, %	Контроль	I група	II група
CD95, нейтрофіли	9,3±1,78	6,3±0,48*	3,8±0,36**
CD95, мононуклеари	30,7±2,67	33,7±2,45	21,3±2,07**

*Примітка. * - достовірність відмінності (p<0,05) у порівнянні із контролем; ** - достовірність відмінності у порівнянні між групами*

Обговорення результатів дослідження. Отримані результати показали, що у хворих на БА, які мають нормальну масу тіла (I група), спостерігається підвищення апоптозу лімфоцитів та сповільнення – нейтрофілів. Подовжене виживання нейтрофілів на фоні постійної гормональної терапії демонструє поряд із давновідомими побічними ефектами глюкокортикостероїдів ще один їх негативний ефект – антиапоптичну дію на нейтрофіли. У пацієнтів із ожирінням (II група) виявлено затримку апоптозу як лімфоцитів, так і нейтрофілів у порівнянні із пацієнтами I групи та з контролем.

Феномен затримки апоптозу лімфоцитів, досліджений раніше низкою вчених [13,16,17,18], є важливим, ключовим фактором патогенезу алергічного запалення при БА. Механізми, що лежать в основі затримки апоптозу лімфоцитів при БА, далекі від цілковитого розуміння, хоча принципово можна передбачити, що при алергічному запаленні внаслідок певних причин у клітинному мікрооточенні порушений баланс між індукторами апоптозу та факторами, що сприяють виживанню клітин.

Виявлене нами сповільнення апоптозу лімфоцитів периферичної крові при поєднанні БА та ожиріння має важливе патогенетичне значення, оскільки затримка апоптозу активованих лімфоцитів призводить до інфільтрації ними бронхів із звільненням широкого спектру цитокінів, які здатні залучати у вогнище запалення різні запальні клітини [19]. Важливим є те, що набір цитокінів як сигнальних молекул визначає на пара- та аутокринному рівнях не тільки фізіологічну активність, а і численність клітинних популяцій, регулюючи апоптоз.

Отримані нами дані про посилення апоптозу лімфоцитів у хворих на БА з нормальною масою тіла при системному використанні гормонів співзвучні з даними багатьох досліджень [20,21,22]. У дослідженнях Oneda K. (1999) підтверджено те, що дексаметазон індукує фрагментацію ДНК більшою мірою у хворих на бронхіальну астму, ніж у здорових. Аналогічні дані були отримані при дослідженні впливу інгаляційних ГКС (флутиказону пропіонату) на апоптоз *in vivo* та *in vitro* периферичних Т-лімфоцитів з використанням як контролю цілої низки методів оцінки апоптозу (зв'язування анексіну 5, електрофоретична ідентифікація фрагментів ДНК, вміст ДНК, визначення маркерів, пов'язаних із апоптозом: Fas, Bcl-2, Вах) [19]. Ці спостереження дозволяють пояснити нам досить високий рівень апоптозу лімфоцитів у хворих на БА (I група), які приймали протягом тривалого часу системні ГКС, у порівнянні із здоровими (p < 0,05). Проте проапоптичний ефект ГКС відносно до лімфоцитів не був реалізованим у хворих із поєднанням БА та ожиріння, що може свідчити про превалювання антиапоптичних стимулів у пацієнтів із зайвою масою тіла. У дослідженнях Минєєва В.Н. (2003) вперше було виявлено підвищене

виживання нейтрофілів у хворих на atopічну БА, що автор пояснив відомим антиапоптичним ефектом ГМ-КСФ відносно гранулоцитів. Зіставлення рівня апоптичних нейтрофілів периферичної крові та мокротиння у даних хворих показало тісний кореляційний зв'язок між цими двома пулами клітин. Приймання системних ГКС сприяло більш вираженому гальмуванню апоптозу нейтрофілів. Цей феномен протилежної дії ГКС на апоптоз нейтрофілів у порівнянні з їх впливом на апоптоз еозинофілів і лімфоцитів автор пояснив різним впливом ГКС на ГМ-КСФ. Якщо ГКС (дексаметазон) пригнічують антиапоптичний ефект ГМ-КСФ відносно еозинофілів, то стосовно нейтрофілів ГКС навпаки його підвищують. У наших дослідженнях виявлено гальмування апоптозу нейтрофілів у хворих обох груп, хоча більш виражене воно було у хворих II групи ($p < 0,05$), незважаючи на ідентичні дози ГКС, які використовували хворі даних груп. Отже, подовжене виживання нейтрофільних гранулоцитів в астматиків із ожирінням регулюється іншими антиапоптичними чинниками.

Проведене нами вперше дослідження взаємозв'язку між апоптозом нейтрофілів та експресією ними CD95 показало, що у міру зменшення кількості апоптичних нейтрофілів зменшувалася експресія маркера готовності до апоптозу.

Мінімальний його рівень відмічався у хворих на БА у поєднанні із ожирінням. Отже, можна думати про те, що гальмування апоптозу нейтрофілів при важкій гормонально залежній БА відбувається на рівні Fas-залежних механізмів, а міра його вираженості залежить від маси тіла пацієнтів.

Поряд із зниженням експресії маркера готовності до апоптозу (CD95) на нейтрофілах його експресія на мононуклеарах периферичної крові у хворих I групи не відрізнялася від контрольної величини, хоча була зниженою у хворих II групи ($p < 0,05$). Відсутність змін з боку експресії CD95 на мононуклеарах може бути пов'язана із зміною фенотипу циркулюючих Т-лімфоцитів. Як відомо, у хворих на важку гормонально залежну БА зрушення клітинної ланки імунітету полягають у зниженні Т-супресорної популяції (CD8) при практично незміненому рівні Т-хелперів (CD4)[24]. Показник кількості CD95⁺-клітин у нефракціонованій суміші лімфоцитів найбільшою мірою відображає стан CD4⁺ субпопуляції Т-лімфоцитів, оскільки у дорослих осіб клітин серед CD4⁺, що мають Fas-рецептор, втричі більше, ніж серед CD8⁺, і в 2-3 рази більше, ніж серед В-лімфоцитів, тоді як натуральні кілери (CD16⁺) у нормі взагалі не експресують CD95⁺ [25].

Згідно з результатами нашого дослідження підвищений вміст апоптичних лімфоцитів у хворих, які постійно отримували системні ГКС і мали нормальну масу тіла (I група), не був пов'язаний із рівнем експресії маркера готовності до апоптозу. Це може свідчити про те, що участь Fas-рецептора не є обов'язковою і що існують інші механізми запуску апоптозу у даних хворих. Поряд із цим у хворих II групи зниження вмісту апоптичних лімфоцитів супроводжувалося зниженням експресії CD95. Отримані дані свідчать про порушення чутливості лімфоцитів хворих на БА у поєднанні із ожирінням до індукції апоптозу ГКС. Очевидно, передумовою таких зрушень є дисбаланс у співвідношенні експресії ендогенних регуляторів апоптозу, що може бути зумовлене біологічною активністю жирової тканини, зокрема - підвищеною продукцією прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 1, 6, 8, фактору некрозу пухлин) у хворих при констеляції БА та ожиріння.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Встановлено, що при ожирінні у гормонально залежних астматиків,

незважаючи на постійно приймання системних глюкокортикоїдів, знижується спонтанний апоптоз лімфоцитів периферичної крові, що узгоджується із відносною недостатністю експресії CD95, а також зменшенням вмісту апоптичних нейтрофілів та експресії ними маркера готовності до апоптозу. Подовжене виживання лімфоцитів та нейтрофільних гранулоцитів, у свою чергу, може сприяти персистенції та прогресуванню алергічного запального враження дихальних шляхів при БА. Тому взаємозв'язок БА та ожиріння потребує подальших комплексних досліджень імунологічних механізмів, які пов'язують дані захворювання та здатні обтяжувати перебіг даної констеляції.

SUMMARY

Comparison study of apoptosis of blood mononuclear phagocytes and neutrophils was carried out in 32 asthmatic patients with normal and obesity. The reduction of spontaneous apoptosis of mononuclear phagocytes and neutrophils was revealed in overweight patients. It was accompanied by relative insufficiency of Fas-receptor's expression on cell surfaces. This is a one of aggravating mechanisms of bronchial asthma course in these patients.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аметов А.С. Ожирение – эпидемия XXI века // *Терапевт. архив*. - 2002. - №10. - С.5-7.
2. Chen Y., Dales R., Krewski D., Breithaupt K. Increased effects of smoking and obesity on asthma among female Canadians: the National Population Health Survey, 1994-1995 // *Am. J. Epidemiol.* - 1999. - V. 150, № 3. - P. 255-262.
3. Guerra S., Sherrill D.L., Bobadilla A., Martinez F.D., Barbee R.A. The relation of body mass index to asthma, chronic bronchitis, and emphysema // *Chest*. - 2002. - V. 122, № 4. - P. 1256-1263.
4. Herberd A., Rossner S. Body weight characteristics of subjects on asthma medication // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* - 2000. - V. 24, № 9. - P. 1217-1225.
5. Hakala K., Stenius-Aarniala B., Sovijarvi A. Effects of weight loss on peak flow variability, airway obstruction, and lung volumes in obese patients with asthma // *Chest*. - 2000. - V. 118, № 5. - P. 1315-1321.
6. Минеев В.Н., Несторович И.И., Оранская Е.С., Тафеев А.Л. Апоптоз и активность рибосомальных цистронов клеток периферической крови при бронхиальной астме // *Аллергология*. - 2003. - №1. - С.17-24.
7. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа // *Иммунология*. - 1999. - №1. - С.17-24.
8. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Механизмы апоптоза лимфоцитов периферической крови больных атопической бронхиальной астмой // *Аллергология*. - 2001. - №1. - С.3-9.
9. Ohta K., Yamashita N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1999. - V. 104, №1. - P. 14-21.
10. Traffic of new eosinophils from bone-marrow to airways during exposure to allergen: rol of bone-marrow IL-5-receptor / Tomaki M., Zhao L.L., Lundahl J. et al. // *Eur. Respir. J.* - 1999. - V. 14, №3. - 279 s.
11. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma / Vignola A.V., Chiappara G., Siena L. et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2001. - V. 108, № 5. - P. 738-746.
12. Bcl-2 expression in sputum eosinophilis in patients with acute asthma / Jang A.S., Choi I.S., Lee S., Seo J.P., Yang S.W., Park C.S. // *Thorax*. - 2000. - V. 55, № 5. - P. 370-374.
13. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma / A. Hamzaoui, K. Hamzaoui, H. Salah et al. // *Mediators Inflamm.* - 1999. - V. 8, № 4-5. - P. 237-243.
14. Apoptosis, proliferation and expression of BCL-2, Fas-ligand in bronchial biopsies from asthmatics / A. Druilhe, B. Wallaert, A. Tscopoulos et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* - 1998. - V. 19, № 5. - P. 747-757.
15. Федосеев Г.Б. Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия. - С.-Пб.: Нордмедиздат, 1998. - 688с.
16. Delayed eosinophil apoptosis in asthma / H. Kankaanranta, M.A. Lindsay, M.A. Gienbycz et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2000. - V. 106, Pt.1, №1. - P. 77-83.
17. 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. Immunol.* - 1999. - V.103, №4. - P. 555-558.
18. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma / S. Jayaraman, H. Castro, M. O'Sullivan et al. // *J. Immunol.* - 1999. - V. 162, №3. - P. 1717-1722.
19. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects / M. Melis, L. Siena, E. Pace et al. // *Eur. Respir. J.* - 2002. - V. 19, № 2. - P. 257-266.
20. Increased allergen-specific, steroid-sensitive gamma delta T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma / F. Spinozzi, E. Agea, O. Bistoni et al. // *Ann. Intern. Med.* - 1996. - V.124, №2. - P. 223-227.
21. Johnson M. Development of fluticasone propionate and comparison with other inhaled corticosteroids // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1998. - V.101, Pt.2. - P. 434-439.
22. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Механизмы дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов при атопической бронхиальной астме // *Пульмонология*. - 2003. - №2. - С.10-16.
23. Oneda K. Dexamethasone - induced apoptosis in peripheral T lymphocytes from patients with asthma // *Alerugi*. - 1999. - V. 48, №1. - P. 13-22.
24. Малышева Н.Н., Валиев Р.Ш., Нехорошкова З.М. и др. Иммунная защита при гормональнозависимой форме бронхиальной астмы // *Проблемы туб.* - 2000. - №2. - С.40-42.

25. 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.

Надійшла до редакції 7 квітня 2004 р.