

Оригинальная статья

УДК 616.24-002-017

РОЛЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ В ВОСПАЛЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ И РЕМИССИИ

Н.А Распопина¹, А.Е. Шуганов², Ф.Н.Палеев², Ж.М Салмаси³, Е.А Шелест²

¹ГОУ ВПО 1 МГМУ им. И.М.Сеченова, ²МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского,

³-им. Н. И. Пирогова ГОУ ВПО РНИМУ Росздрава, г. Москва, Россия

LYMPHOCYTE CYTOTOXICITY ROLE IN INFLAMMATION PROCESS IN COPD PATIENTS DURING DISEASE EXACERBATION AND REMISSION

Raspopina N.A.¹, Shuganov A.E. ², Paleev F.N. ², Salmasi J.M. ³, Shelest E.A. ²

¹ I.M. Sechenov 1st Moscow State medical University, ²M.F. Vladimirovskii MONIKI,

³N.I. Pirogov RNIMU Roszdrav, Moscow, Russian Federation

Резюме

Состояние иммунной системы исследовалось на примере содержания в крови цитотоксических лимфоцитов, таких как цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки у больных ХОБЛ 2 стадии (37 больных) в стадию обострения и ремиссии и у здоровых доноров (24 человека), составивших группу сравнения. Методами непрямой иммунофлуоресценции определялось относительное и абсолютное содержание периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD54, CD71, CD72, HLA-DR, CD95, мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG. В результате проведенного исследования оказалось, что у больных ХОБЛ наблюдалось существенное увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов, независимо от стадии заболевания ($p < 0,001$). В период обострения ХОБЛ в сыворотке крови больных существенно увеличивается количество CD4, CD8, CD20, CD72, NK-клетки, mIgG+-лимфоцитов и mIgM+-лимфоцитов, вне обострения нормализуется уровень CD20, CD72, однако, количество остальных цитотоксических клеток остается высоким, что поддерживает воспаление и прогрессирующее повреждение ткани легких и бронхов.

Ключевые слова: ХОБЛ, иммунное воспаление ткани легких и бронхов, цитотоксические лимфоциты.

Resume

The immune system was studied on the example of the blood levels of cytotoxic lymphocytes, such as cytotoxic T lymphocytes and NK- cells in patients with COPD stage 2 (37 patients) in the stage of exacerbation and remission, and healthy controls (24 men), making the comparison group . Methods of indirect immunofluorescence was determined relative and absolute content of peripheral blood lymphocytes expressing the antigens CD3, CD4,

CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD54, CD71, CD72, HLA-DR, CD95, and membrane immunoglobulin smlgM mlgG. The study proved that patients with COPD had a significant increase in the blood levels of cytotoxic lymphocytes , regardless of the stage of disease ($p < 0,001$). During an exacerbation of COPD in the serum of patients significantly increases the number of CD4, CD8, CD20, CD72, NK- cells , mlgG +- lymphocytes and mlgM + lymphocytes , without exacerbation normalized level CD20, CD72, however, the number of other cytotoxic cells remains high, supports progressive inflammation and tissue damage lungs and bronchi.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), immune inflammation of lung and bronchial tissues, cytotoxic lymphocytes.

Введение

ХОБЛ это хроническое воспалительное заболевание, для которого характерно прогрессирующее, лишь частично обратимое ограничение воздушного потока в результате поражения мелких бронхов и легочной ткани с развитием пневмофиброза и эмфиземы, с множественными внелегочными проявлениями. Особенностью ХОБЛ является неумолимо прогрессирующее течение, особенно если продолжается воздействие на пациента патологических агентов [6]. В результате воздействия раздражителей, например, сигаретного дыма, в воздухоносных путях развивается естественный воспалительный ответ, который характеризуется увеличением количества нейтрофилов макрофагов и лимфоцитов CD8+, повышается концентрация многих медиаторов воспаления [5]. Течение любого хронического заболевания характеризуется периодами обострения и ремиссии. Как известно, в период обострения, например при бронхиальной астме, активность воспалительного процесса повышается,

в период ремиссии эти процессы существенно уменьшаются, что проявляется уменьшением числа клеток воспаления и количества цитотоксических медиаторов. В период ремиссии прогрессирование болезни замедляется или останавливается [4]. Однако при ХОБЛ, как показывают наблюдения. Остановить прогрессирование болезни практически не удается, что и обуславливает постоянное ухудшение бронхиальной проходимости [4,12]. В последние годы появился ряд публикаций о важной роли цитотоксических лимфоцитов в патогенезе ХОБЛ, однако результаты этих исследований неоднозначны [8, 10, 12].

Цель исследования: оценить состояние иммунной системы у больных ХОБЛ в стадию обострения и ремиссии по изменению содержания в периферической крови различных популяций и субпопуляций лимфоцитов, в том числе цитотоксических лимфоцитов (цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки).

Материалы и методы

Исследование проводилось на пациентах 2-х групп: 1 группа - практически здоровые люди в возрасте от 36 до 56 лет (20 мужчин и 4 женщины) (средний возраст 52,6+/-2,8 лет), 2-я группа - 37 мужчин, страдающих ХОБЛ среднетяжелого течения (II стадия) [1]. В возрасте от 50 лет до 75 (средний возраст 58,1+/-1,6 лет). Все пациенты с ХОБЛ имели индекс курения не менее 20 пачка-лет, у них отсутствовали данные об атопии и бронхиальной астмы в анамнезе. Забор крови проводился в период обострения ХОБЛ до назначения СГКС и/или антибиотиков и при клинически стабильном состоянии в течение последующих 4-х недель.

Оценка функции внешнего дыхания проводилась согласно протоколу "Стандартизация легочных функциональных тестов" Европейского Респираторного Общества с помощью спирометрии на аппарате компьютерного пневмотахографа «CustoVit» (Австрия). Оценивались показатели: - FEV1, FEV1%FVC, FVC а также величина дыхательного сопротивления - ВДС (комплексный показатель бронхиальной обструкции, не зависящий от влияния способности пациента выполнять дыхательный маневр).

В соответствии с поставленной задачей исследования использовались методы непрямой иммунофлюоресценции для определения относительного и абсолютного содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD56, CD72 мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG с

помощью отечественных моноклональных антител ЛТ и ИКО в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Подробно методика описана в предыдущих наших работах [1,2]. В качестве вспомогательных методов проводилось выделение лимфоцитов по методу Voym в градиенте плотности фиколл-верографии, оценка жизнеспособности лимфоцитов сразу после выделения из крови и подсчета их абсолютного числа в периферической крови по критериям Фримель [3].

Статистическая обработка полученных результатов с целью оценки достоверности регистрируемых изменений проводили при большой выборке с помощью критерия t Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов - с применением непараметрического критерия Вилксона-Манна-Уитни.

Расчеты проводили на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ "Statistica".

Результаты и обсуждение

В соответствии с целью настоящего исследования получены характеристики иммунных изменений при ХОБЛ, при этом особо пристальное внимание было уделено представительству в периферической крови трех основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-клеток и субпопуляций Т - и В-лимфоцитов.

Как известно, для клинической иммунологии наибольший интерес представляет изучение экспрессии мембранных гликопротеидных молекул, обозначаемых как CD3-, CD4- и CD8-антигены и характеризующих Т-клеточное звено иммунной системы. CD3-антиген является составной частью мембрано-ассоциированной структуры – антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TcR/CD3), обеспечивающей запуск процессов антигензависимой активации Т-клетки [5]. Молекулы CD4 и CD8, распознающие структурные детерминанты антигенов соответственно II и I классов главного комплекса гистосовместимости, обеспечивают процесс иммунологического ограничения, а также способны самостоятельно, без участия TcR/CD3 передавать активирующий Т-клетку сигнал [6]. И, наконец, несмотря на известные ограничения, антигены CD3, CD4 и CD8 остаются широко используемыми маркерами для количественной оценки всей популяции Т-клеток (CD3), хелперно-индукторной (CD4) и супрессорно-цитотоксической

(CD8) субпопуляций Т-лимфоцитов [3,4].

По мнению многих исследователей, изучение Т-клеточного звена иммунной системы позволяет выявлять и нарушение соотношения хелперных/цитотоксических лимфоцитов. [7]

В результате проведенного исследования оказалось, что у больных ХОБЛ наблюдалось существенное увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов, независимо от стадии заболевания ($p < 0,001$). При этом в стадию ремиссии наблюдалось также снижение содержания в крови Т-лимфоцитов до $52,28 \pm 2,27\%$ по сравнению со здоровыми людьми, т.е. высокое содержание Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD4+CD8+ ($18,44 \pm 4,02\%$), что, по-видимому, является отражением чрезмерной стимуляции

Т-клеточного звена иммунной системы у этих пациентов (рисунок 1).

Представляет интерес изучение еще одной популяции лимфоцитов, такой как естественные киллерные клетки (NK-клетки), отличающиеся от Т- и В-лимфоцитов по происхождению, и выполняемым функциям. NK-клетки первыми настраиваются на защиту организма против чужеродных и измененных клеток. Отличаются естественные киллерные клетки от основных популяций лимфоцитов и поверхностными рецепторами. В качестве маркера NK-клеток используют поверхностные антигены CD16 (низкоаффинный рецептор для Fc фрагмента IgG) и CD56, который необходим для осуществления лизиса клеток-мишеней.

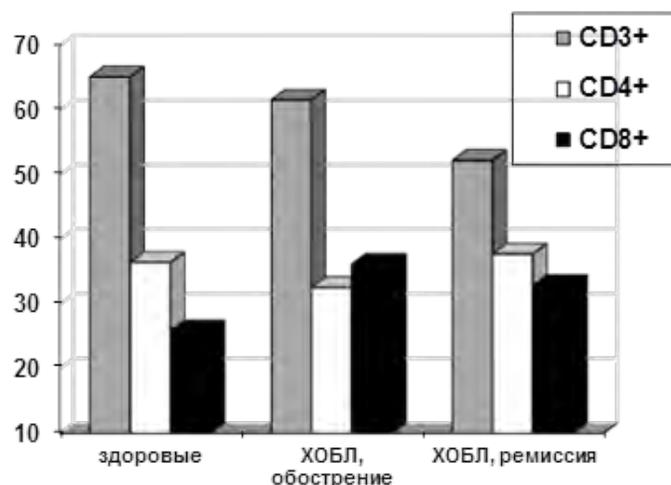


Рисунок 1. Содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания.

При изучении содержания естественных натуральных киллеров в крови больных ХОБЛ выявлено выраженное повышение содержания в крови количества NK-клеток (рисунок 2) ($p < 0,0001$) по сравнению со здоровыми пациентами. По-видимому,

резкое увеличение содержания NK клеток при ХОБЛ связано с увеличением в крови концентрации γ -интерферона в крови больных с тяжелым и среднетяжелым течением ХОБЛ [8].

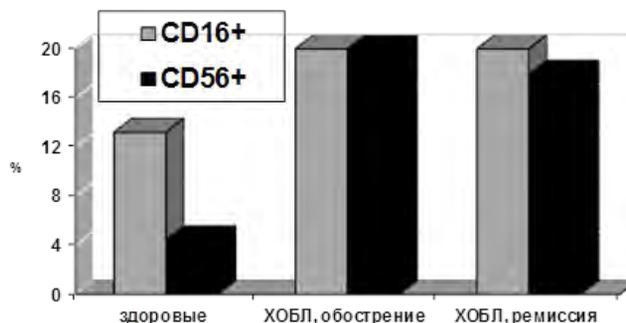


Рисунок 2. Содержание естественных киллеров в крови больных ХОБЛ.

Не менее важным является изучение и В-клеточного звена иммунной системы, основанное также на выявление различных маркеров В-лимфоцитов. Это объясняется тем, что В-лимфоциты по своим функциональным свойствам предназначены для реализации реакций гуморального иммунитета посредством выработки специфических антител. Среди наиболее важных маркеров, характеризующих В-клеточное звено, выделяют такие антигены как CD20-, CD72-, CD38-, mIgM и mIgG. CD20-антиген характеризует общее количество В-лимфоцитов.

Таблица 1. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных хронической обструктивной болезнью легких в зависимости от стадии заболевания (в %).

Популяции лимфоцитов	Маркеры лимфоцитов	Здоровые доноры n=24	Больные ХОБЛ n=37	
			в стадии обострения n=32	в стадии ремиссии n=25
Т-лимфоциты	CD3	65,20±0,66	61,65±2,95	52,28±2,26**
	CD4	36,48±0,95	32,60±0,71*	37,86±2,61
	CD8	25,90±0,50	36,23±2,54***	32,92±1,96**
NK-клетки	CD16	13,22±0,43	25,24±3,16***	22,11±1,07***
	CD56	4,47±0,09	22,18±2,13***	17,94±1,99***
В-лимфоциты	CD20	10,15±0,16	26,35±1,92***	11,56±0,61
	CD72	10,10±0,39	18,56±2,34**	10,34±1,40
	mIgM	5,13±0,18	29,14±2,18***	13,13±0,99**
	mIgG	6,54±0,48	21,65±1,15***	12,88±1,60**

*-p<0,05; **-p<0,01; ***-p<0,001 (по сравнению с донорами)

Отличительной особенностью созревающих и зрелых В-лимфоцитов является наличие поверхностных иммуноглобулиновых молекул. Активно синтезируемые поверхностные иммуноглобулины отсутствуют на других клетках иммунной системы и с высокой степенью достоверности характеризуют

Мембранный гликопротеид CD72 обнаруживается на всех В-лимфоцитах в периферической крови и в костном мозге, исключая плазматические клетки [8]. Биологическая роль CD72-антигена заключается в активации зрелых В-лимфоцитов [7, 11].

Исследование содержания В-лимфоцитов в периферической крови больных в стадию обострения при ХОБЛ демонстрирует увеличение всех дифференцированных форм В-лимфоцитов (таблица 1).

В-клетки [7,13]. Основными изотипами мембранных иммуноглобулинов (mIg) являются mIgM и mIgD. mIgG представлен на небольшом количестве В-лимфоцитов. Однако это количество может увеличиваться при связывании клеток с иммуноглобулином через Fc-рецептор.

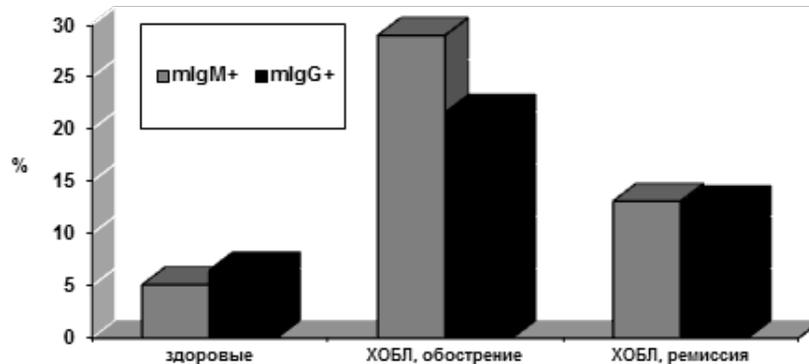


Рисунок 3. Содержание зрелых В-лимфоцитов в крови больных ХОБЛ.

Анализ содержания в периферической крови зрелых В-клеток, несущих поверхностные иммуноглобулины М и G (рисунок 4), в нашем исследовании показал их существенное увеличение у больных ХОБЛ, по отношению к здоровым людям, независимо от стадии заболевания (рисунок 3).

Из представленных результатов следует, что у обследованных больных ХОБЛ в стадии обострения имеет место существенное повышение количества В-лимфоцитов всех стадий дифференцировки, что свидетельствует об активации В-клеточного звена иммунной системы в целом. Существенное повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины позволяют, в свою очередь, утверждать, что у больных ХОБЛ В-клеточная активация является отражением постоянно поддерживаемого процесса антигенной стимуляции с хроническим течением. Для больных ХОБЛ, независимо от стадии заболевания характерно резкое увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов, в том числе цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток.

В стадии обострения мы наблюдали однонаправленное изменение всех субпопуляций В-лимфоцитов в сторону увеличения. В то время как в стадию ремиссии ХОБЛ, в отличие от стадии обострения, не отмечено достоверных изменений содержания в периферической крови общего количества В-лимфоцитов (CD20+), а также лимфоцитов, экспрессирующих CD72-антигены. В тоже время, количество зрелых В-лимфоцитов, начавших синтез антител и экспрессирующих иммуноглобулины на клеточной мембране (mIgM+ лимфоциты) и в стадии ремиссии исследуемой патологии увеличивается. При этом остается высоким и содержание mIgG+ лимфоцитов.

Итак, проведенное исследование характера иммунных изменений при ХОБЛ выявило что, независимо от стадии заболевания ХОБЛ и в период ремиссии и при обострении характерно резкое увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов: как цитотоксических Т-лимфоцитов так и NK-клеток. Вероятно, именно резкое повышение цитотоксических лимфоцитов в организме больных ХОБЛ играет ведущую роль в поддержании воспалительного процесса, приводящего к повреждению легочной ткани, быстром развитию эмфиземы и пневмосклероза у больных ХОБЛ.

Список литературы

1. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Зильбер И.Е. и др. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов при ХОБЛ. X Международный конгресс. «

Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии. С 304.20-23 мая.2009. г.Казань

2. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М. Макарьков А.И. Механизмы регуляции экспрессии поверхностных структур дифференцированного лимфоцита. Иммунология-1997.-№3.с.4-8

3. Фримель Г. Иммунологические методы. Перевод с нем.яз. М. «Медицина».1987.-472 с.

4. Chapman K.R., Boulet L.P., Rea R.M., Franssen E. //Suboptimal asthma control prevalence detective and consequences in general practice.-Eur.Respir.J. 2008;31:320-332.

5. Donaldson G.D. Seemungal T.A.R., Bhoumik A., Wedzicha J.A. //Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstruction lung disease.- Thorax.2002;57:847-852

6. Global Initiative for Chronic Obstruction Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / Updated 2011.(www.goldcopd.com)

7. Fairclough L., Urbanowicz R.A., Corne J., et al.// Killer cells in chronic obstructive pulmonary disease.- ClinSci (Lond) 2008; 114: 533-541

8. Folli C, Chiappori A, Pellegrini M, Garelli V, Riccio AM, De Ferrari L, Braidò F, Canonica GW.// COPD treatment: real life and experimental effects on peripheral NK cells, their receptors expression and their IFN- γ secretion.- Pulm Pharmacol Ther. 2012; 25(5):371-6

9. Harnett M., Rigley K.//The role of G-proteins versus protein tyrosine kinases in the regulation of lymphocyte activation.- Immunol.Today-1992.- V.13N12-P.482-486

10. Hodge G., Mukaro V., Holmes M., Reynolds P.N., Hodge S. // Enhanced cytotoxic function of natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway - Respirology.- 2013; 18(2):369-76.

11. Howard L.M. Reed D.J. CD 72 ligation regulates defective naïve newborn B-cell responses/Cell Immunol.1997.Feb.1;175 (2)-179-88

12. Lacota A, Prat C, Andreato F., et al.//Biomarkers in the management of COPD.- Eur.Respir.J.2009;18(112):96-104

13. Robertson M.J, Cameron C. et al.//Cortimulation of human natural killer cell proliferation : role of accessory cytokines and cell dependent signals.- Nat. Immun.1996-1997;15(5):213-26

Soler-Cataluna J.J, Martinez-Garcia M.A. et al.//Severe acute exacerbation and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease.- Thorax .2005;60:925-931.