

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

¹I.M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, ²M.F. Vladimirskii 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 mIgM mIgG. 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, mIgG +- lymphocytes and mIgM + 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 (рисунок1).

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.

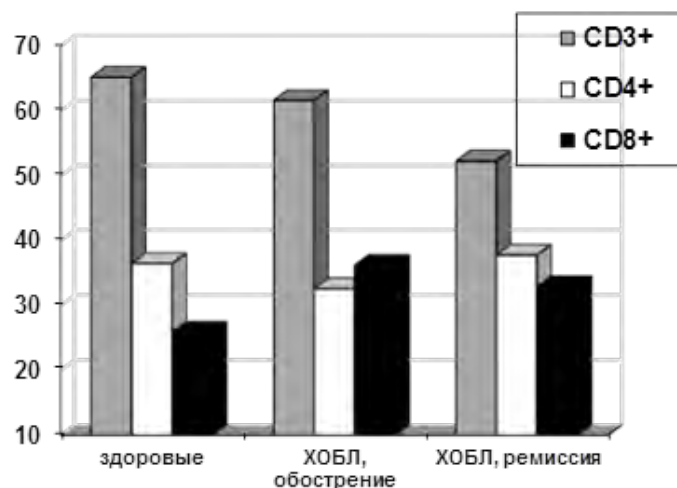


Рисунок 1. Содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания.

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].

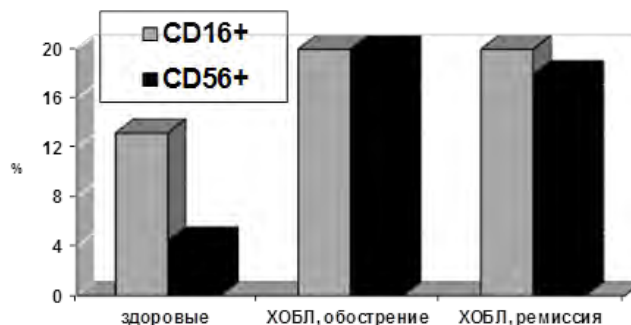


Рисунок 2. Содержание естественных киллеров в крови больных ХОБЛ.

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.

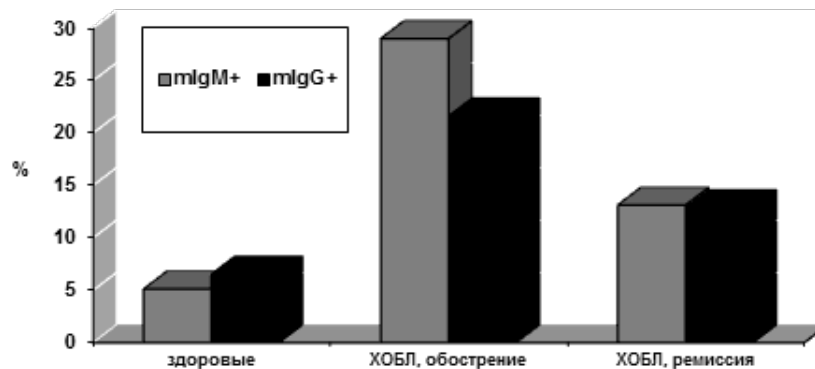


Рисунок 3. Содержание зрелых В-лимфоцитов в крови больных ХОБЛ.

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 развитии 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., Ringley 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 - Respiriology.- 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.