

УДК 616:34:008:97:616:233-007.271]:616.155.32:577.15

Г. Д. Коваль
Л. Я. Федонюк

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ВПЛИВ ДИСБІОЗУ КИШЕЧНИКА НА АКТИВНІСТЬ КАСПАЗИ-8 І КАСПАЗИ-3 У ЛІЗАТІ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ОБСТРУКТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Ключові слова: хронічні обструктивні захворювання легень, дисбіоз, лімфоцити, апоптоз, імунодефіцит.

Резюме. Проведено дослідження активності каспаз у лізаті лімфоцитів у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень із порушенням мікробіоценозу кишечника з метою визначення ролі апоптозу лімфоцитів у механізмах розвитку Т-клітинного дефіциту. Показано, що при дисбіозі III ступеня спостерігається зниження кількості $CD3^+$ - і $CD8^+$ -клітин, а у пацієнтів із порушенням мікробіоценозу кишечника IV ступеня в периферійній крові зменшується рівень лімфоцитів фенотипів - $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, що супроводжується пригніченням реакції бласттрансформації лімфоцитів у відповідь на ФГА. Активність каспази-8, каспази-3 та каспази-1 у лізаті лімфоцитів у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень набуває високих величин при дисбіозі III і IV ступеней.

Вступ

Літературні дані свідчать, що наявність фонового дисбіозу кишечника асоціюється з важким клінічним перебігом хронічних обструктивних захворювань легень (ХОЗЛ) [1]. Доведено, що порушення мікробіоценозу кишечника при ХОЗЛ корелюють зі змінами функціонування імунної системи [2]. Результати імунологічного обстеження свідчать, що у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом кишечника має місце більш низький рівень $CD3^+$ -лімфоцитів і проліферативної відповіді лімфоцитів на Т-клітинні мітогени за тестом реакції бласттрансформації лімфоцитів з ФГА, ніж у клінічних групах хворих без супутнього дисбіозу. Окрім того, для хворих на ХОЗЛ із дисбіозом характерним є зниження рівня в крові $CD8^+$ -лімфоцитів при загостренні запального процесу в бронхах, тоді як у хворих на ХОЗЛ без супутнього дисбіозу кишечника рівень клітин із фенотипом $CD3^+CD8^+$ не змінюється. Отримані результати пояснюються з позицій міграції визначених клонів Т-лімфоцитів in loco morbi, що визначає переважну запальну інфільтрацію бронхів $CD8^+$ -лімфоцитами при ХОЗЛ, яка є типовою для цього захворювання. Проте, якщо при ХОЗЛ без супутнього дисбіозу міграція певних клонів лімфоцитів, що визначає характер запального процесу в бронхах, не супроводжується відповідним їх зниженням в периферійній крові, то при наявності дисбіозу кишечника це зниження є відображенням вираженого імунного дисбалансу, проявом більш значної тимічної недостатності [1].

© Г. Д. Коваль, Л. Я. Федонюк, 2010

Мета дослідження

Визначити роль апоптозу лімфоцитів у механізмах розвитку Т-клітинного дефіциту у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень із порушенням мікробіоценозу кишечника.

Матеріал і методи

Обстежено 98 хворих на хронічні обструктивні захворювання легень віком від 17 до 75 років. Серед них жінок – 41, чоловіків – 57. Методом мікробіологічного аналізу у 12 пацієнтів діагностовано нормоценоз кишечника (1 група), у 11 осіб – дисбіоз I ступеню (2 група), у 15 хворих – дисбіоз II ступеню (3 група), у 23 осіб – дисбіоз III ступеню (4 група), у 37 хворих – дисбіоз IV ступеню (5 група). Групу контролю склали 17 практично здорових осіб віком від 17 до 70 років. Хронічні обструктивні захворювання легень діагностували на підставі аналізу клінічного перебігу захворювання та результатів спірографічного обстеження (прогресуюче зниження показників тесту Тіфно) [3]. Лікування хворих на ХОЗЛ проводили за загальноприйнятою методикою.

Для оцінки стану клітинного імунітету проводили визначення субпопуляцій лімфоцитів за кластерами детермінації $CD3^+$, $CD4^+$ $CD8^+$ із використанням панелі моноклональних антитіл до лейкоцитарних диференційованих антигенів серії LT НПО "Сорбент" (Росія). Препарати досліджували на люмінесцентному мікроскопі "МЛ-2" (Росія). Реакцію бластної трансформації лімфоцитів проводили з використанням в якості Т-клі-

тинного мітогену фітогемаглютиніну. Активність каспази-3 і каспази-8 визначали в лізаті лімфоцитів (10^5 /мл), який отримували методом заморожування-розморожування після виділення лімфоцитів із периферійної крові за допомогою центрифугування на градієнті щільності фіколверографіну. У роботі використовували реактиви фірми BioVision (США) з реєстрацією показників на мультискані «Уніплан-М» (Росія). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з визначенням t-критерію Стьюдента за програмою «BioStat» [4].

Обговорення результатів дослідження

Кількість $CD3^+$ -клітин у крові хворих на ХОЗЛ з нормоценозом та дисбіозом I і II ступенів не відрізнялася від контрольних показників (табл. 1).

Водночас у пацієнтів з порушенням мікробіоценозу кишечника III і IV ступенів спостерігалось зменшення кількості Т-лімфоцитів у периферійній крові відносно контролю відповідно на 12,8 і 27,3%. У хворих на ХОЗЛ із дисбіозом III ступеня вміст у крові $CD3^+$ -клітин був на 11,2% меншим, ніж у пацієнтів з нормоценозом. У разі порушення видового складу кишкової мікрофлори IV ступеня рівень Т-лімфоцитів у периферійній крові був найнижчим, складаючи 72,7% від контролю, 74,0% - від даних у пацієнтів з нормоценозом та 75,3, 80,5 і 83,3% - від такого у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом I, II і III ступенів, відповідно. Вміст у крові $CD4^+$ -клітин відповідав конт-

рольним величинам у хворих усіх досліджуваних груп за виключенням пацієнтів з дисбіозом IV ступеню, в яких спостерігалось зменшення кількості $CD4^+$ -лімфоцитів відносно контролю на 27,8%, а в порівнянні з показниками у хворих на ХОЗЛ із нормоценозом та з дисбіозом I, II і III ступенів - на 26,5, 26,4, 26,5 і 19,6%, відповідно. Кількість у периферійній крові $CD8^+$ -лімфоцитів не змінювалася у пацієнтів із нормоценозом та у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом I і II ступенів, тоді як у пацієнтів із порушенням видового складу кишкової мікрофлори III і IV ступенів вміст у крові $CD8^+$ -клітин достовірно знижувався. Останній у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом III ступеня був на 23,2% меншим за контроль і на 23,3, 19,0 і 17,4% нижчим за рівень $CD8^+$ -лімфоцитів у пацієнтів із нормоценозом та дисбіозом I і II ступенів. Найменший рівень $CD8^+$ -клітин спостерігався у хворих із дисбіозом IV ступеню, який складав від контролю лише 66,9%, а від показників у пацієнтів із нормоценозом та у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом I, II і III ступенів - відповідно 66,9, 70,6, 72,0 і 87,2%. Не дивлячись на зменшення кількості як $CD4^+$ -, так і $CD8^+$ -клітин, імунорегуляторний індекс у жодній із досліджуваних груп хворих достовірних змін не зазнавав. Отримані результати узгоджуються з даними літератури [1].

Для визначення механізмів встановленого послаблення клітинного імунітету у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом проведено дослідження апоптозу лімфоцитів, ефекторами якого є каспази, зок-

Таблиця 1

Вміст Т-лімфоцитів та їх субкласів у крові хворих на хронічні обструктивні захворювання легень із різним ступенем дисбіозу ($x \pm Sx$)

Групи хворих	$CD3^+$ %	$CD4^+$ %	$CD8^+$ %	$CD4^+/CD8^+$
Контроль, n=17	67,53±2,16	46,12±1,96	22,82±1,49	2,14±0,15
1 група, n=12	66,33±2,71	45,33±2,63	22,83±1,79	2,11±0,20
2 група, n=11	65,18±3,16	45,27±3,03	21,64±1,24	2,17±0,21
3 група, n=15	60,93±2,69	45,33±2,65	21,20±1,15	2,26±0,21
4 група, n=23	58,89±2,16 p<0,01 p ₁ <0,05	41,42±1,94	17,52±0,96 p<0,01 p ₁ <0,01 p ₂ <0,02 p ₃ =0,02	2,60±0,19
5 група, n=37	49,08±1,58 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	33,32±1,75 p<0,001 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01 p ₃ <0,001 p ₄ <0,01	15,27±0,59 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,05	2,31±0,16

Примітка. p - ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; p₁ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів I групи; p₂ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 2 групи; p₃ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 3 групи; p₄ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 4 групи; n - число спостережень

Таблиця 2

Активність каспаз в лізаті лімфоцитів хворих на хронічні обструктивні захворювання легень з різним ступенем дисбіозу ($\bar{x} \pm Sx$)

Групи хворих	Каспаза-8 UE/ml	Каспаза-3 UE/ml	Каспаза-1 UE/ml
Контроль, n=17	1,005±0,092	0,812±0,078	0,502±0,054
1 група, n=12	1,036±0,151	0,987±0,132	0,722±0,109
2 група, n=11	1,090±0,129	0,902±0,120	0,793±0,119 p<0,02
3 група, n=15	1,213±0,115	1,047±0,109	0,886±0,103 p<0,01
4 група, n=23	1,422±0,094 p<0,01 p ₁ <0,05 p ₂ =0,05	1,260±0,091 p<0,001 p ₂ <0,05	1,112±0,086 p<0,001 p ₁ =0,01 p ₂ <0,05
5 група, n=37	1,967±0,097 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	1,903±0,088 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	1,680±0,080 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001

Примітка. p - ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; p₁ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 1 групи; p₂ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 2 групи; p₃ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 3 групи; p₄ - ступінь достовірності різниць показників відносно таких у пацієнтів 4 групи; n - число спостережень

рема каспаза-8 і каспаза-3. Каспаза-1, як відомо, передає стимулюючий сигнал на продукцію цитокінів, що підвищують функціональну активність фагоцитуючих клітин крові [5]. Результати дослідження активності каспаз в лізаті лімфоцитів (10^5 клітин/мл) наведені у табл. 2.

Активність каспази-8 у лізаті лімфоцитів хворих на ХОЗЛ із нормоценозом, а також у пацієнтів із дисбіозом I і II ступенів не відрізнялася від контрольних показників. У хворих на ХОЗЛ із дисбіозом III ступеня активність каспази-8 збільшувалася відносно контролю на 41,5%, а в пацієнтів із дисбіозом IV ступеню - на 95,7%. Активність каспази-8 при порушенні видового складу кишкової мікрофлори III ступеня була більшою, ніж при нормоценозі та дисбіозі I ступеню відповідно на 37,3 і 30,5%, однак від показників у хворих із дисбіозом II ступеню достовірно не відрізнялася. У хворих на ХОЗЛ із дисбіозом IV ступеню в лізаті лімфоцитів периферійної крові спостерігалася найбільша активність каспази-8, яка перевищувала таку в пацієнтів із нормоценозом і у хворих із порушенням мікробіоценозу кишечника I, II і III ступенів на 89,9, 80,5, 62,2 і 38,3%, відповідно. Активність каспази-3 достовірно не відрізнялася від контрольних показників як у хворих на ХОЗЛ із нормоценозом, так й у пацієнтів із дисбіозом I і II ступенів. При дисбіозі III ступеня активність цього ферменту зроста-

ла відносно контролю на 55,2%, а при порушенні видового складу кишкової мікрофлори IV ступеню активність каспази-3 досягала найвищих показників і була в 2,3 рази більшою, ніж в осіб контрольної групи. При дисбіозі III ступеня активність каспази-3 перевищувала таку в пацієнтів із порушенням мікробіоценозу кишечника I ступеня на 39,7%, але достовірно не відрізнялася від показників у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом II ступеня. Водночас у пацієнтів із максимальним порушенням видового складу кишкової мікрофлори активність каспази-3 була більшою, ніж у хворих на ХОЗЛ із нормоценозом і дисбіозом I, II і III ступенів відповідно в 1,9, 2,1, 1,8 і 1,5 рази.

Активність каспази-1 у пацієнтів із нормоценозом підвищувалася відносно контролю не достовірно, тоді як у хворих на ХОЗЛ із порушенням видового складу кишкової мікрофлори цей показник суттєво перевищував контрольні величини: при дисбіозі I ступеня - на 58,0%, II ступеня - на 76,5%, III ступеня - в 2,2 рази, IV ступеня - в 3,3 рази. Активність каспази-1 у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом III ступеня була більшою, ніж у пацієнтів із нормальним мікробіоценозом кишечника та у хворих із дисбіотичними порушеннями I ступеня - на 54,0 і 40,2% відповідно, але достовірно від активності каспази-1 у пацієнтів із дисбіозом II ступеню не відрізнялася. При порушенні видового складу кишкової мікрофлори IV

ступеня активність каспази-1 перевищувала показники у хворих всіх досліджуваних груп: пацієнтів із нормоценозом - у 2,3 рази, хворих із дисбіозом I ступеня - в 2,1 рази, II ступеня - на 89,6%, III ступеня - на 51,5%.

Таким чином, активність каспази-8, каспази-3 і каспази-1 у лізаті лімфоцитів хворих на ХОЗЛ набуває високих величин саме при дисбіозі III і IV ступенів, хоча і не виявляє чіткої прямопорційної залежності від ступеня порушень видового складу кишкової мікрофлори.

За сучасними уявленнями, апоптоз є однією з фундаментальних форм реакції клітин на зовнішні та внутрішні сигнали, альтернативою проліферації та диференціювання. Ключовою для апоптозу визнана послідовність біохімічних реакцій - каскадна активація каспаз. Контролюють розвиток апоптозу продукти протоонкогенів, які або сприяють активації каспаз, або блокують цей процес. Найбільш відомими є Bcl-2, гомодимерна форма якого інгібує апоптоз, тоді як гетеродимер Вах/Bcl-2 активує його, а також Bcl-x, що існує в двох формах (як наслідок альтернативного сплайсингу) - "довгої", Bcl-x_i, яка інгібує апоптоз, і "короткої", Bcl-x_s, що стимулює його розвиток. Існують три шляхи індукції апоптозу. Перший реалізується через спеціалізовані рецептори - Fas (CD95) і рецептор фактора некрозу пухлин - TNFR1 (CD120a) з активацією каспаз 8 (Fas) і 2 (TNFR1). За іншим механізмом апоптоз також реалізується через рецептори, але в разі відсутності або нестачі сигналізації. Зокрема, юні предшественники практично всіх кровотворних ліній потребують для виживання зовнішніх сигналів, джерелом яких є цитокіни. При активації лімфоцитів наявність антигену на тлі відсутності кошти мулюючих сигналів, які надходять у Т-клітині через CD28, а в В-клітині - через CD40, викликає їх анергію або апоптоз. Крім того, апоптозом завершується активація лімфоцитів в умовах дефіциту ростових факторів (для Т-клітин - ІЛ-2, для В-клітин - ІЛ-4), так само, як і в разі повторної дії факторів росту на попередньо активовані клітини. Третій механізм пов'язаний з виникненням внутрішнього сигналу, що індукує апоптоз (накопичення нерепарованих розривів ДНК або її модифікація), який реалізується за участі ядерного білка р53 [6,7]. Можна припустити, що апоптоз лімфоцитів у хворих на ХОЗЛ із дисбіозом реалізується за участі першого або другого механізму, оскільки порушення мікробіоценозу кишечника суттєво впливає на фактори регуляції імунної відповіді [1,8,9,10].

Висновок

У хворих на ХОЗЛ із нормоценозом, а також із дисбіозом I-II ступенів змін вмісту в крові CD3⁺-

клітин, CD4⁺- і CD8⁺-лімфоцитів не виявляється. При дисбіозі III ступеня спостерігається зниження кількості CD3⁺- і CD8⁺-клітин, а в пацієнтів із порушенням мікробіоценозу кишечника IV ступеня в периферійній крові зменшується рівень лімфоцитів усіх трьох фенотипів - CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, що супроводжується пригніченням реакції бласттрансформації лімфоцитів у відповідь на ФГА. Активність каспази-8, каспази-3 і каспази-1 у лізаті лімфоцитів хворих на ХОЗЛ набуває високих величин при дисбіозі III і IV ступенів.

Перспективи подальших досліджень

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні ролі апоптозу лімфоцитів у механізмах розвитку Т-клітинного дефіциту у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень.

Література. 1. Білоглазов В.О. Роль дизбактеріозу і цитокінів слизової оболонки кишківника в формуванні системного і регіонального імунного дисбалансу у хворих на бронхіальну астму і хронічні обструктивні захворювання легень / В.О. Білоглазов // Актуальні проблеми клінічної імунології та алергології. - 1998. - № 3. - С. 32-40. 2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник // Одесса: Астро Принт, 1999. - С. 98-102. 3. Грипти М.А. Патологическая физиология легких. Пер. с англ. / М.А. Грипти // М.: Бином, 1997. - 344 с. 4. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С.Гланц // М.: Практика, 1999. - 459 с. 5. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е.Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология. - 2002. - Т. 47, № 2. - С.35-40. 6. Петухов В.И. Роль Fas-опосредованного апоптоза в реализации противоопухолевого эффекта а-интерферона при хроническом миелолейкозе / В.И. Петухов // Гематология и трансфузиология. - 2000. - Т. 45, № 4. - С.29-33. 7. Скворцова В.И. Участие апоптоза в формировании инфаркта мозга / В.И. Скворцова // Инсульт. - 2001. - № 2. - С.12-18. 8. Варбанец Л.Д. Эндотоксинная грамотрицательных бактерий: структура и биологическая роль / Л.Д. Варбанец // Микробиол. ж. - 1994. - Т. 56, № 3. - С.76-97. 9. Возианов А.Ф. Цитокіни. Биологические и противоопухолевые свойства / А.Ф. Возианов, А.К. Бутенко, К.П. Зак // К.: Наукова думка, 1998. - 313 с. 10. Дизрегуляция иммунологических механизмов и фагоцитарной активности лейкоцитов - ведущая причина остро го воспаления / А.И. Воложин // Патол. физиология и эксперим. терапия. - 1997. - № 2. - С. 29-31.

ВЛИЯНИЕ ДИСБИОЗА КИШЕЧНИКА НА АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-8 И КАСПАЗЫ-3 В ЛИЗАТЕ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Г. Д. Коваль, Л. Я. Федонюк

Резюме. Проведено исследование активности каспаз в лизате лимфоцитов больных хроническими обструктивными заболеваниями легких с нарушением микробиоценоза кишечника с целью определения роли апоптоза лимфоцитов в механизмах развития Т-клеточного дефицита. Показано, что при дисбиозе III степени наблюдается снижение количества CD3⁺- и CD8⁺-клеток, а у пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника IV степени в периферической крови уменьшается уровень лимфоцитов фенотипов - CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, что сопровождается угнетением реакции бласттрансформации лимфоцитов в ответ на ФГА. Активность каспазы-8, каспазы-3 и каспазы-1 в лизате лимфоцитов больных хроническими заболеваниями легких повышается до высоких величин при дисбиозе III и IV степени.

Ключовые слова: хронические обструктивные болезни легких, дисбиоз, лимфоциты, апоптоз, иммунодефицит.

**DYSBIOSIS INFLUENCE ON ACTIVITY OF
CASPASE-8 AND CASPASE-3 IN THE
LYMPHOCYTES' LYSATE OF PATIENTS WITH
CHRONIC OBSTRUCTIVE DISEASES OF LUNGS**

G. D. Koval, L. Ya. Fedonyuk

Abstract. The research of caspases' activity in the lymphocytes' lysate has been carried out with the purpose to determine the role of lymphocytes' apoptosis in the mechanism of the development of T-cellular's deficiency in chronic obstructive bronchitis patients with an infringement of microbiocenosis of intestine. It has been shown that the lowering of quantity of CD₃⁺ and CD₈⁺-cellulars under dysbiosis of the 3rd degree is observed and patients with the infringement of microbiocenosis of the intes-

tine of the 4th degree have the lowering of the level of lymphocytes of all phenotypes - CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺ in peripheral blood, that is accompanied by oppression of the reaction of lymphocytes' blasttransformation in answer to Ph.G.A. An activity of caspase-8, caspase-3 and caspase-1 acquires high values in the lysate of lymphocytes of patients with ChOB under dysbiosis of 3rd, 4th degrees.

Key words: the chronic obstructive diseases of lungs, dysbiosis, lymphocytes, apoptosis, immunodeficiency.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2010. - Vol.9, №4 (34). - P.38-42.

*Надійшла до редакції 25.10.2010
Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький
© Г. Д. Коваль, Л. Я. Федонюк, 2010*