

## ЭКСПРЕССИЯ CD95 НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ АБДОМИНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Акимова В.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина (7910, Львов-10, ул. Пекарская, 69, кафедра клинической лабораторной диагностики), e-mail: [viorika\\_76@mail.ru](mailto:viorika_76@mail.ru)

Проведен анализ особенностей экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови и цитокиновой регуляции апоптоза при острых и хронических воспалительных заболеваниях органов брюшной полости. Целью работы было выявление общих и дифференциальных признаков острого и хронического воспаления при различных нозологических формах абдоминальной патологии. Обследовали пациентов с острым флегмонозным аппендицитом (ОФА, n=40), острым гангренозным аппендицитом (ОГА, n=17), острым мезаденитом (ОМ, n=27), абдоминальным туберкулезом (АТ, n=60). Изучение популяционного состава лимфоцитов крови проводили с помощью моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD56, CD95) иммунофлюоресцентным методом. Уровни TNF- $\alpha$ , IL2 определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом. Для изучения особенностей иммунного реагирования при обострении хронических процессов обследовали больных АТ после иммунопровокационной пробы Коха (АТК, n=40). Установлено, что для ОГА характерны более высокие уровни IL2 и TNF $\alpha$  по сравнению с ОФА. При АТ концентрации изучаемых цитокинов были на уровне ОФА и ОМ. При обострении АТ повышается концентрация IL2 и TNF- $\alpha$ . При всех патологиях выявили достоверно повышенный уровень экспрессии CD95 на лимфоцитах крови. Таким образом, как при хроническом, так и при остром воспалении наблюдается повышенный уровень экспрессии CD95 (готовность к апоптозу), а различия выявлены для IL2 и TNF- $\alpha$ , которые являются регуляторами процесса апоптоза. Изучения особенностей цитокиновой регуляции апоптоза лимфоцитов крови дает возможность прогнозировать развитие воспалительного процесса.

Ключевые слова: воспаление, абдоминальный туберкулез, иммунопровокационная проба Коха, острая абдоминальная патология, цитокины.

## CD95 EXPRESSION ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN ACUTE AND CHRONIC ABDOMINAL DISEASES

Akimova V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Lviv national medical university named by Danylo Galitski, Lviv, Ukraine (7910, Lviv – 10, Pekarska str, 69), e-mail: [viorika\\_76@mail.ru](mailto:viorika_76@mail.ru)

The analysis of CD95 expression features on peripheral blood lymphocytes and features of cytokine regulation of apoptosis in acute and chronic inflammatory diseases of the abdominal cavity was held. The patients with acute phlegmonous appendicitis (AFA, n=40), acute gangrenous appendicitis (AGA, n=17), acute mezadenitis (AM, n=27), abdominal tuberculosis (AT, n=60) were examined. The study of lymphocyte populations was performed using monoclonal antibodies to differential lymphocyte antigens (CD3, CD4, CD8, CD56, CD95) by immunofluorescent method. Levels of TNF- $\alpha$ , IL2 were determined in serum by ELISA. To study the immune response during exacerbation of chronic processes in patients with AT after immunoprovocative Koch reaction (ATK, n=40) was made. It was found higher levels of IL2 and TNF $\alpha$  in AGA compared with OFA. In patients with AT concentrations of studied cytokines were at AFA and OM level. During AT exacerbation the concentration of IL2 and TNF- $\alpha$  increased. The expression of CD95 on peripheral blood lymphocytes in all pathologies significantly increased. Thus, as in chronic and acute inflammation is observed with increased expression CD95 (readiness to apoptosis), and differences were found for IL2 and TNF- $\alpha$ , which are regulators of apoptosis. The exploration feature of cytokine regulation of apoptosis of lymphocytes allows predicting the development of the inflammatory process.

Keywords: inflammation, abdominal tuberculosis, Koch immunoprovocative trial, acute abdominal pathology, cytokines.

### Введение

Одним из ведущих патофизиологических механизмов защиты в ответ на внедрение инфицирующего агента, введение антигена или физическое повреждение тканей является

воспаление. Механизм течения воспалительного процесса сложен и многогранен. Несмотря на большой фактический материал, собранный исследователями, на данном этапе развития науки актуальным становится поиск патогенетических связей, раскрытие регуляторных механизмов при различных воспалительных заболеваниях. Важным механизмом поддержания корректного числа клеток в многоклеточном организме является апоптоз или запрограммированная клеточная смерть. В иммунной системе он является одним из основных регуляторов численности популяций клеток. Именно этот процесс ограничивает экспансию активированных клонов, препятствуя развитию воспаления и аутоиммунных реакций. «Активационный» апоптоз развивается в результате дисбаланса активационных сигналов и / или вследствие экспрессии и последующего связывания специализированных рецепторов индукции апоптоза. Процесс запрограммированной гибели клетки осуществляется и контролируется иммунными механизмами [1, 2, 9]. Путем апоптоза регулируется ответ иммунокомпетентных клеток на антигенные стимулы, определяется характер, динамика и длительность иммунного ответа, формирование иммунологической толерантности.

В XX веке был открыт на цитоплазматической мембране клеток первый специализированный рецептор из семейства TNF-рецепторов для индукции апоптоза – CD95 (Fas/Apo-1). Описан соответствующий индукторный фактор Fas-лиганд. Fas-лиганд экспрессируется на поверхности лимфоцитов. Экспрессия Fas-рецептора на клеточной мембране означает готовность клетки к апоптозу, однако для запуска процесса необходимо действие индукторов. Известна группа физиологических активаторов и ингибиторов апоптоза [3, 8]. В качестве индуцирующих апоптоз факторов выступают провоспалительные цитокины (ФНО- $\alpha$ ,  $\gamma$ -интерферон). Этот показатель был предложен в качестве субклинического предвестника активизации иммунопатологического процесса.

В иммунной системе CD95 и CD95L вовлечены в опосредованную Т-лимфоцитами цитотоксичность. На периферии зрелые Т-клетки, распознавая аутоантигены, элиминируются с участием Fas-рецепторов. Для обеспечения удаления активированных лимфоцитов в завершающей фазе иммунного ответа должен быть запущен процесс устранения лимфоцитов [1, 4]. В основном CD95L экспрессируется активированными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, в то время как покоящиеся Т-лимфоциты не экспрессируют Fas-лиганд. [5]. Т-хелперы 1 типа способны лизировать клетки-мишени более активно, чем Т-хелперы 2 типа путем Fas-опосредованного механизма [9]. При взаимодействии CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов с лигандом (мембранным или растворимым) инициируется возможность запуска процесса апоптоза, который может быть подавлен антиапоптотическим действием продуктов генов, блокирующих апоптоз. Поэтому снижение процентного содержания лимфоцитов, чувствительных к индукции апоптоза, может быть причиной нарушения процесса

элиминации активированных форм лимфоцитов. Поскольку апоптоз играет важную роль в элиминации аутореактивных клеток, контролирует длительность, интенсивность иммунного ответа, степень повреждения тканей и является механизмом, поддерживающим баланс лимфоидных клеток в организме [5, 4], то изучение особенностей этого процесса при патологии носит важный прогностический характер.

Актуальность данного исследования объясняется все большим распространением в последнее время воспалительных заболеваний с вялотекущими процессами и возникающей в связи с этим необходимостью углубленного изучения патогенетических механизмов воспаления с позиций типового патологического процесса.

**Цель исследования** – изучить проапоптотические факторы (экспрессию CD95 на лимфоцитах крови, цитокиновые факторы регуляции апоптоза) у больных острыми и хроническими абдоминальными заболеваниями.

**Материал и методы исследования.** В исследовании принимали участие 30 здоровых доноров крови и 176 больных с острой и хронической абдоминальной патологией. Кровь на обследование забирали при поступлении пациента в больницу с явлениями «острого живота». Среди обследованных больных у 40 пациентов имелась острая абдоминальная патология в виде острого флегмонозного аппендицита (ОФА); у 17 больных – острый гангренозный аппендицит (ОГА); у 27 больных – острый неспецифический мезаденит (ОМ); у 40 больных – абдоминальный туберкулез (АТ). Диагнозы выставляли на основании гистологического заключения после аппендектомии. Кроме того, отдельно изучали влияние иммунопровокационной пробы Коха на иммунный статус больных АТ (40 обследованных) (группа АТК). Пробу Коха проводили с 20 туберкулиновыми единицами очищенного туберкулина с подкожным его введением. При активном туберкулезе через 72 часа после подкожного введения туберкулина возникала общая, местная и очаговая реакция. Для оценки пробы Коха дополнительно изучали изменения в иммунном статусе.

Из показателей иммунного статуса определяли абсолютное количество лимфоцитов (ЛЦ) в крови и их популяционный состав непрямым иммунофлюорисцентным методом с использованием моноклональных антител к дифференцировочным антигенам («Сорбент», Москва, РФ). Определяли количество Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>), NK-клеток (CD56<sup>+</sup>), маркер негативной активации CD95<sup>+</sup> (Fas рецептор). Концентрацию интерлейкина 2 (IL-2), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментных тест-систем («Diaclone» Франция). Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы «STATISTICA 6.0».

## Результаты исследования и их обсуждение

С целью изучения особенностей клеточного звена иммунитета при острых и хронических абдоминальных заболеваниях изучали популяционную структуру лимфоцитов периферической крови. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Популяционная структура лимфоцитов периферической крови больных острыми и хроническими абдоминальными заболеваниями,  $M \pm m$ .

	Контроль, n=30	ОМ, n=27	ОФА, n=41	ОГА, n=17	АТ, n=60	АТК, n=40
ЛЦ, Г/л	2,0±0,08	2,17±0,16	1,79±0,02	2,06±0,03	2,05±0,03	2,44±0,01*
CD3 <sup>+</sup> , Г/л	1,07±0,08	1,1±0,12	0,91±0,08*	1,05±0,16	1,06±0,09	1,30±0,02*#
CD4 <sup>+</sup> , Г/л	0,93±0,05	0,65±0,08*	0,50±0,04*	0,62±0,09*\$	0,67±0,05*	0,80±0,06*#
CD8 <sup>+</sup> , Г/л	0,33±0,04	0,45±0,06*	0,39±0,03	0,43±0,06*	0,37±0,03	0,50±0,04*#
CD56 <sup>+</sup> , Г/л	0,15±0,01	0,51±0,06*	0,41±0,04*	0,46±0,07*	0,44±0,04*	0,51±0,04*#

Примечание: \* – достоверность отличия показателя по сравнению с контролем; # – достоверность отличия показателя по сравнению с группой АТ; \$ – достоверность отличия показателя по сравнению с группой с ОФА, ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что уровень лимфоцитов во всех обследованных группах существенно не отличался от показателя в контрольной группе. Однако внутри популяции лимфоцитов наблюдается определенное перераспределение. Как при остром воспалении, так и при хроническом, достоверно снижен уровень Т-хелперов. В группе с ОМ наблюдали достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение количества Т-хелперов на 30 %, в группе с ОФА – на 46 %, в группе ОГА – на 33 %, в группе АТ – на 28 %, при обострении абдоминального туберкулеза (группа АТК) – на 14 % по сравнению с контрольной группой. Поскольку Т-хелперы определяют интенсивность и направленность иммунологических реакций их уменьшение в периферической крови возможно связано с рециркуляцией лимфоцитов и участием этих клеток в иммунологических реакциях в зонах воспаления. Обострение туберкулезного процесса вызвало повышение лимфоцитов в периферической крови на 19 % и всех субпопуляций по сравнению с группой с АТ.

При острых неспецифических абдоминальных заболеваниях (мезаденит, острый гангренозный аппендицит) наблюдалось увеличение пула Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) в то время как при АТ количество CD8<sup>+</sup> лимфоцитов не отличалось от контрольного значения. Однако при обострении хронического воспаления посредством проведения пробы

Кожа уровень Т-цитотоксических лимфоцитов повысился на 35 % по сравнению с уровнем при хроническом процессе. Такая картина еще раз подтверждает тот факт, что при бактериальных процессах Т-цитотоксические лимфоциты являются основными эффекторными клетками [6].

Наряду с выраженным субпопуляционным дисбалансом среди Т-лимфоцитов в периферической крови наибольшие отклонения обнаружены для CD56<sup>+</sup>- лимфоцитов (NK-клеток). Повышение количества NK-клеток носило выраженный характер с высокой степенью достоверности, как при острых воспалительных заболеваниях, так и при хронических специфических процессах. При остром мезадените и обострении абдоминального туберкулеза (АТК) уровень натуральных киллеров (CD56<sup>+</sup>) был в 3 раза выше контрольных показателей.

Такие изменения популяционного состава лимфоцитов крови закономерно дополняют картину угнетения Т-клеточного звена с повышением продукции цитотоксических клеток-эффекторов при воспалительных процессах. На основании полученных результатов исследований можем сделать заключение об активации клеточно-опосредованных механизмов иммунитета, особенно килерного звена, на фоне умеренного Т-клеточного иммунодефицита.

Поскольку одним из иммунорегуляторных механизмов является апоптоз, то следующим этапом исследований была оценка экспрессии CD95 на лимфоцитах крови, как мембранного маркера готовности к апоптозу. Изучение процессов апоптоза выступает неотъемлемой частью изучения иммунопатологических процессов на данный час [7]. В связи с этим была произведена оценка относительного количества лимфоцитов в периферической крови, экспрессирующих Fas-рецептор. Результаты представлены на рис. 1.

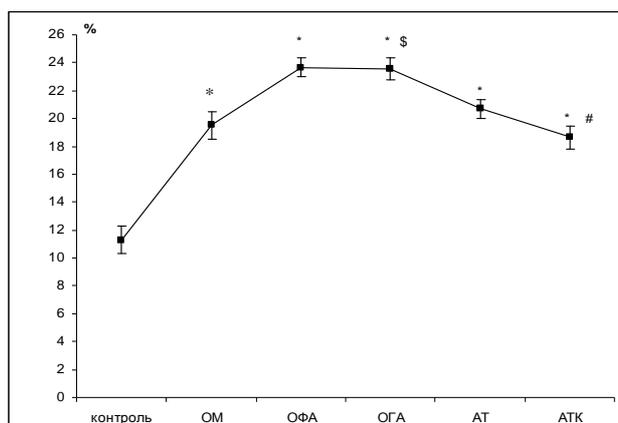


Рис. 1. Экспрессия CD95 на лимфоцитах периферической крови при острых и хронических абдоминальных заболеваниях, M±m

Примечание: \* – достоверность отличия показателя по сравнению с контролем; # – достоверность отличия показателя по сравнению с группой АТ; \$ – достоверность отличия показателя по сравнению с группой с ОМ ( $p < 0,05$ ).

В результате исследований выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение во всех группах обследованных количества лимфоцитов крови, экспрессирующих CD95. Так при ОМ уровень CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов составил  $19,53 \pm 0,98$  %, что в 1,7 раза выше контрольного значения ( $11,3 \pm 0,97$  %). При ОФА и ОГА уровень лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, был в 2 раза выше; при абдоминальном туберкулезе – в 1,8 раза выше контрольного значения; при АТ после пробы Коха – в 1,7 раза выше. Известно, что экспрессия клетками CD95 отражает лишь готовность клетки к рецепции апоптогенного сигнала и повышается она при активации клетки. Снижение активности процессов апоптоза при выраженной активации лимфоцитов приводит к развитию аутоиммунной и онкопатологии [1, 2, 7]. Наши исследования показали, что при активном остром воспалительном процессе наряду с активацией иммунокомпетентных клеток уровень клеток, экспрессирующих Fas-рецептор, повышен независимо от нозологии.

Следующим этапом было определение участия цитокинов в регуляции апоптоза. Известно, что TNF- $\alpha$  является мощным индуктором апоптоза, а IL2 – относится к физиологическим ингибиторам апоптоза. Интерлейкин 2 продуцируют активированные Т-хелперы 1 типа, которые также продуцируют и некоторое количество TNF- $\alpha$  [5]. Результаты исследований представлены на рис. 2.

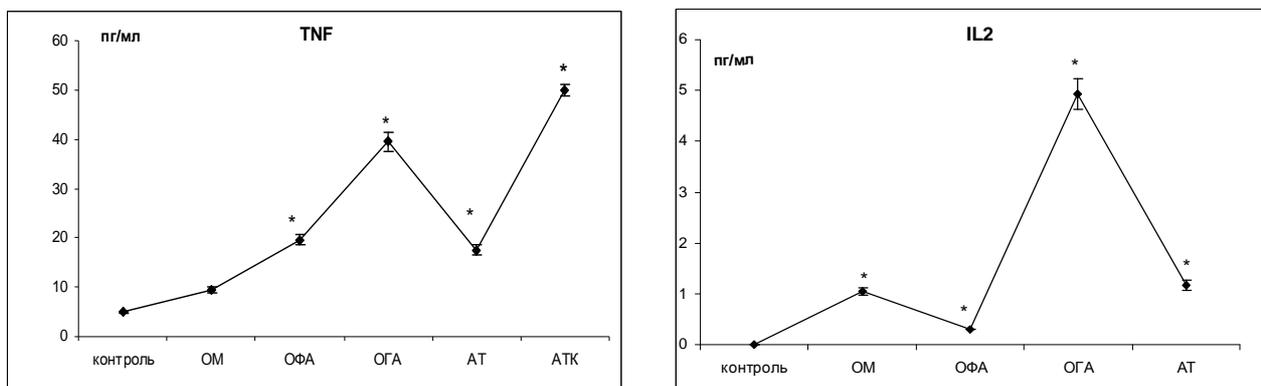


Рис. 2. Концентрация TNF $\alpha$  и IL2 в сыворотке крови при воспалительных заболеваниях органов брюшной полости

Примечание: \* – достоверность отличия показателя по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

При ОГА более выражено достоверное возрастание концентрации TNF- $\alpha$  (в 7,9 раз) по сравнению с контрольной группой. При ОФА концентрация TNF- $\alpha$  достоверно ( $p < 0,05$ ) в 3,9 раз превышает уровень контроля. Также сравнительный анализ результатов показал, что TNF- $\alpha$  определяется в высоких концентрациях при деструктивных формах воспаления: при ОГА концентрация TNF- $\alpha$  в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ОФА. При АТ уровень

TNF- $\alpha$  в 3,5 раза выше контрольного значения и после проведения пробы Коха возрастает еще в 2,8 раза. Концентрация IL2 в сыворотке крови практически здоровых людей ничтожно мала  $0,01 \pm 0,001$  пг/мл. При воспалении его уровень возрастает в десятки раз и при ОГА соответствовал  $4,93 \pm 0,3$  пг/мл, при АТ –  $1,16 \pm 0,1$  пг/мл.

Уровни исследуемых цитокинов не превышают 50 пг/мл для TNF- $\alpha$  и 5 пг/мл для IL2, что свидетельствует об активации иммунорегуляторных процессов. Таким образом, наши исследования подтверждают тот факт, что при воспалении (хроническом и остром) наблюдается повышенный уровень экспрессии CD95 (готовность к апоптозу), а различия выявлены для IL2 и TNF- $\alpha$ , которые являются регуляторами процесса апоптоза. Изучения особенностей цитокиновой регуляции апоптоза лимфоцитов крови дают возможность прогнозировать развитие воспалительного процесса при заболеваниях, выявить дисбаланс иммунорегуляторных механизмов, оптимизировать диагностическую и лечебную тактику.

**Выводы.** В результате проведенных исследований установлено что, как при хроническом, так и при остром воспалении наблюдается повышенный уровень экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови (готовность к апоптозу). Различия выявлены для концентрации IL2 и TNF- $\alpha$ , в сыворотке крови, которые на системном уровне являются регуляторами процесса апоптоза. Изучения особенностей цитокиновой регуляции апоптоза лимфоцитов крови дают возможность расширить знания о развитии воспалительного процесса с позиций типового патофизиологического процесса.

### Список литературы

1. Апоптоз в иммунологических процессах / Р.И. Сепиашвили, М.Г. Шубич, Н.В. Колесникова [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2000. – № 1(1). – С. 15–23.
2. Барышников А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 309 с.
3. Пальцев М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А.Иванов, С.Е. Северин. – М.: Медицина, 2003. 2-е изд., перераб. и доп. – 188 с.
4. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–243.
5. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М., 2000. – 582 с.
6. Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких / Е,Ф. Чернушенко, Л.П. Кадан, О.Р. Панасюкова [и др.] // Украинский пульмунологический журнал. – 2010. – № 2. – С. 39–43.

7. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология. – 1996. – № 6. – С. 10–23.
8. Fas S. Death receptor signaling and its function in the immune system / S. Fas, B. Fritzsching, E. Suri-Payer [et al.] // Curr. Dir. Autoimmun. – 2006. Vol. 9. – P. 13-19.
9. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis / M.O. Hengartner // Nature. – 2000. Vol. 407. – P. 770-776.
10. Kabelitz D. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes / D. Kabelitz, T. Pohl, A. Pechhold // Immunol. Today. – 1993. Vol. 4. – P. 338-339.

**Рецензенты:**

Лаповец Л.Е., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики Львовского национального медицинского университета имени Данила Галицкого, г. Львов.

Скибчик В.А., д.м.н., профессор кафедры семейной медицины Львовского национального медицинского университета имени Данила Галицкого, г. Львов.