БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 612.248 – 073 - 076

РІВЕНЬ ВІЛЬНИХ РАДИКАЛІВ ТА ЇХ ВПЛИВ НА РІВЕНЬ СУБПОПУЛЯЦІЙ Т-ЛІМФОЦИТІВ ТА СД 2-ЗАЛЕЖНУ АДГЕЗІЮ ЇХ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

Войтович О.В., пошукач

Запорізький державний інститут удосконалення лікарів

Вільні радикали (ВР) – продукти аеробного метаболізму, що утворюються в реакціях оксидазного і оксигеназного окислення. У нормі утворення ВР, є регульованим процесом, що відображає інтенсивність реакцій акумуляції і трансформації енергії та синтезу ряду біологічно- активних речовин. Серед останніх простагландіни і лейкотрієни– продукти ферментативного перекісного окислення (ПО) арахідонової кислоти [1,2]. В умовах надлишку ВР на тлі локального дефіциту компонентів антиоксидантної системи, реакції ПО можуть протікати і без участі оксигеназ – неферментативне ПО [1,3]. Вважають, що основними ВР, які ініціюють неферментативне ПО, є супероксидний аніон-радикал ($\cdot O_2^-$), гідроксильний радикал ($\cdot OH$) і оксид азоту (NO) [4]. Основними джерелами зазначених ВР прийнято вважати фагоцитуючі клітини [5,6,7]. ВР крім бактерицидної та позаклітинної цитотоксичної активності відносно чужорідних клітин, спричиняють неспецифічне пошкодження структурних компонентів (нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди) аутологічних клітин [4,7]. Надлишкова генерація ВР фагоцитуючими клітинами відбувається як в процесі фагоцитозу, так і під дією цитокінів, продукуємих переважно армованими Т-лімфоцитами [8]. При цьому у фагоцитуючих клітинах різко зростає споживання й окислення глюкози в реакціях пентозо-фосфатного циклу, споживання O_2 з посиленням генерації $\cdot O_2^-$ НАДФ·Н-оксидазною системою. Зазначені процеси об'єднані поняттям - респіраторний вибух [9]. Показано, що $\cdot O_2^-$, що генеруеться моноцитами і поліморфно-ядерними лейкоцитами (ПЯЛ) легко проникає через біологічні мембрани, і саме він індукує неферментативне ПО у нормально функціонуючих аутологічних клітинах [1].

Задача дослідження полягала в порівняльній оцінці продукції $\cdot O_2^-$ моноцитами і ПЯЛ крові хворих змішаною формою бронхіальної астми (БА) у стадії загострення і з'ясуванні впливу цього радикала на СД2-залежну адгезію Т-лімфоцитів [10] і їх субпопуляційний склад [11].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджувалася кров 15 хворих на БА (до призначення лікування) – дослідна група і 16 практично здорових осіб – контрольна група. Групи обстежених були підібрані за віком і статтю.Відбір венозної крові здійснювали в період з 9 до 11 годин. У досліджуваних групах визначали показники лейкограми.

Виділення мононуклеарів (моноцитів, лімфоцитів) і ПЯЛ проводили в градієнті щільності фікол-тріомбрасту за [12]. Життєздатність виділених клітин визначали за [13] з використанням ізотонічного розчину эозину з трипановим синім. У роботі використовували суспензії, що містили не більше 3% мертвих клітни. Про рівень продукції $\cdot O_2^-$ фагоцитуючими клітинами судили за ступенем відновлення тетразолия нітросинього (ТНС) у сині гранули формазану [14,15]. Постановку методу здійснювали за [16], з тією лише різницею, що екстинкцію екстракту формазана вимірювали при 570 нм. Вміст ТНС, відновленого суспензією моноцитів і ПЯЛ визначали за графіком, побудованим в координатах екстинкції розчину формазана проти кількості ТНС в нг у пробі. Відновлення ТНС у формазан проводили в системі НАДФ·Н – феназинметасульфат, причому, кількість утвореного формазану (нг) була пропорційна кількості ТНС. Здатність клітин до відновлення ТНС виражали в нг формазану з розрахунку на одну клітину (нг/клітину). Т-лімфоцити визначали за їхньою здатністтю утворювати розетки з еритроцитами барана (ЕБ) – СД2-залежна адгезія. Визначали рухливість, афінність СД2-рецепторів і здатність до їх реабсорбции Т-лімфоцитами. Субпопуляційну приналежність Т-лімфоцитів визначали за [11]. Щільність експресії СД2-рецепторів оцінювали за кількістю розеток з 10 і більше ЕБ – “морули”.

Обробку отриманих даних проводили з використанням непараметричної статистики, про вірогідність розходжень судили за критерієм Вілкоксона [17]. Кореляційний аналіз проводили за Спірменом [18].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показники лейкограми представлені в таблиці 1. Встановлено, що у хворих на БА в стадії загострення рівень лейкоцитів знаходився в межах норми, знижено абсолютний вміст нейтрофілів, а також відносний і абсолютний вміст моноцитів. Більше 50% моноцитів при цьому були вакуолізовані і мали базофільну цитоплазму. У дослідній групі значно збільшена відносна й абсолютна кількість еозинофілів, серед яких близько 10% паличкоядерних. Відзначено високий вміст лімфоцитів, одна третина яких мала ознаки активації: деконденсация хроматину, поява ядерець.

Виявлені зміни в лейкограмі хворих на БА вказують на активацію і можливу мобілізацію клітин загальної запальної реакції в тканини. Не виключено, що це – відображення їхньої реакції на інфекційний компонент при змішаній формі БА. Високий рівень еозинофілів і лівий зсув у їхній морфології, дозволяють припустити активацію Тх2. Відомо [10], що активовані Тх2 продукують ІЛ-5 - фактор росту і мобілізації еозинофілів, та ІЛ-4 – відповідальній за переключення синтезу Ig M у проліферуючих В-лімфоцитах на синтез Ig E плазматичними клітинами.

Таблиця1 - Показники лейкограми і рівень утворення формазану ПЯЛ і моноцитами у хворих на БА

Показники	Контрольна група		Дослідна група	
	середнє	межі коливань	середнє	межі коливань
Лейкоцити, 10^9 /л	7,5	4,0 – 10,2	6,1	3,3 – 11,0
Нейтрофіли палочкоядерні %	3,2	0 – 6,0	3,1	0 – 8,0
10^9/л	0,24	0 – 0,51	0,19	0 – 0,50
сегментоядерні %	57,8	40,0 – 70,5	51,3	40,0 – 64,0
10^9/л	4,37	2,48 – 6,94	3,13*	1,78 – 5,67
Еозинофіли %	2,7	0 – 10,0	4,4*	0 – 9,0
10^9/л	0,16	0 – 0,62	0,27*	0 – 1,0
Моноцити %	7,2	2,0 – 15,0	4,1*	0 – 12,0
10^9/л	0,52	0,13 – 1,01	0,27*	0 – 1,20
Лімфоцити %	28,7	20,0 – 43,0	36,2*	23,0 – 45,0
10^9/л	2,16	1,02 – 3,44	2,20	1,12 – 4,29
Рівень формазану нг на 1 ПЯЛ, 10^{-3}	17,0	10,0 – 31,0	44,1**	20,0 – 92,0
нг на пул ПЯЛ	77800	44500 – 107300	144600**	55200 - 292500
нг на 1 моноцит,10^{-3}	14,2	2,0 – 26,0	41,1**	23,0 – 95,0
нг на пул моноцитов	7100	1000 - 20200	13800**	3000 – 67200

* - $p < 0,05$
** - $p < 0,01$

Дані дослідження здатності фагоцитуючих клітин відновлювати ТНС представлені в таблиці 1.У контрольній групі здатність ПЯЛ до відновлення ТНС у формазан, порівняно з моноцитами, була вище на 20% у розрахунку на одну клітину, і на 90% у розрахунку на пул циркулюючих клітин. У хворих продукція формазану ПЯЛ була в 2,5 рази вище в розрахунку на один ПЯЛ і в 1,8 рази вище в розрахунку на пул ПЯЛ у циркуляції; для моноцитів цей показник був відповідно в 3 і 4 рази більше у порівнянні з контролем. У підсумку, при БА різниця в здатності до відновлення ТНС між ПЯЛ і моноцитами стає неістотною (близько 6%). Однак, при розрахунку цього показника на пул циркулюючих ПЯЛ, величина його при БА виявляється на порядок вище такої для пула моноцитів. Беручи до уваги той факт, що саме $\cdot O_2^-$ відновлює ТНС у формазан [15,19], можна говорити, що в нормі здатність до генерації $\cdot O_2^-$ притаманна як ПЯЛ, так і моноцитам (у розрахунку на одну клітину). При БА

відзначається значно вища $\cdot O_2^-$ - генеруюча активність. Це підтверджується даними літератури про посилення ВР окислення при БА [20]. З урахуванням пула клітин відзначено, що основними джерелами $\cdot O_2^-$ при змішаній формі БА, є ПЯЛ.

У таблиці 2 представлені дані про стан Т-клітинної ланки адаптивного імунітету. У хворих на БА відзначений вірогідно високий (у 1,3 рази більший) рівень субпопуляції тЕ-РУЛ (тотальні Е-РУЛ). При цьому збільшений (у 2,5 рази) рівень субпопуляції бЕ-РУЛ (безосадові Е-РУЛ). Паралельно відзначене значне (у 4 рази) підвищення рівня субпопуляції сЕ-РУЛ (стабільні Е-РУЛ) і (у 2,5 рази) ауто-РУЛ (Т-лімфоцити, що утворюють розетки з аутологічними еритроцитами). Серед тЕ-РУЛ у дослідній групі значно вище (у 1,5 рази) рівень рЕ-РУЛ (ранніх Е-РУЛ), з якими пов'язують прояв хелперної активності, і знижено (у 1,3 рази) вміст вЕ-РУЛ (відновлених Е-РУЛ), з якими пов'язують прояв супресорно/кілерної активності [11]. При цьому тЕ-РУЛ характеризує загальний рівень Т-лімфоцитів, бЕ-РУЛ – вміст активованих Т-лімфоцитів, сЕ- і ауто-РУЛ – рівень малодиференційованих, наївних Т-лімфоцитів [11]. Сукупність отриманих даних можна розцінити як посилення иммуногенезу Т-лімфоцитів при БА. На користь цього припущення свідчить і висока щільність експресії СД2-рецепторів у Т-лімфоцитів, що характерно для приміруваних Т-лімфоцитів [10]. Підвищення щільності експресії СД2-рецепторів – рецепторів адгезії, відзначене у тЕ-, рЕ- і сЕ-РУЛ, узгоджується з даними літератури про посилення експресії молекул адгезії (L-селектинів) на лімфоцитах при БА [21].

Таблиця 2 - Рівень субпопуляцій Т-лімфоцитів у досліджуваних групах

Субпопуляції Т-лімфоцитів	Контрольна група			Дослідна група		
	Середнє значення і межі коливань		% морул	Середнє значення і межі коливань		% морул
	10^9/л	%		10^9/л	%	
тЕ-РОЛ, (сумарні Т-лімф.)	1,23 0,63 – 1,99	57,6 41,0 –69,0	34,3	1,64* 0,82 – 3,78	73,3 61,0-88.0	54*
бЕ-РОЛ (активовані Т-лімф.)	0,002 0 – 0,02	0,10 0 – 1	0	0,01* 0 – 0,04	0,25* 0 – 1	0
сЕ-РОЛ (наївні Т-лімф.)	0,05 0 – 0,19	2,5 0 – 8	4,6	0,26** 0,04 – 1,0	10,4** 2 - 24	15,2**
ауто-РОЛ (наївні Т-лімф.)	0,08 0,01 – 0,2	3,4 1 – 8	0	0,18** 0,01 – 0,81	8,9** 10 –20,0	0
рЕ-РОЛ (Т-лімф. з хелперною функцією)	0,86 0,38 –1,69	39,1 21,0 –52,0	27,5	1,37** 0,51 –3,17	60,3** 40,0-77,0	57,1**
вЕ-РОЛ (Т-лімф. з супрес./ кілерною функцією)	0,88 0,49 –1,55	41,6 28,0 –59.0	39,3	0,71* 0,27 –1,93	30,5* 17,0-57,0	35,5

* - $p < 0,05$
** - $p < 0,01$

Відомо, що утворювати сЕ- і ауто-РУЛ здатні, як Т-лімфоцити, що не пройшли повний цикл дозрівання в тімусі, так і армовані ефекторні Т-лімфоцити [10,11]. Паралельне збільшення рівня сЕ-РУЛ і ауто-РУЛ, дозволяє припустити посилення і лімфопоезу Т-лімфоцитів.

Кореляційний аналіз (дані представлені в таблиці 3) дозволив виявити наявність позитивного, сильного зв'язку між рівнем еозинофілів і вмістом рЕ-, тЕ- і бЕ-РУЛ. Відзначається такий же тип зв'язку між вмістом паличкоядерних еозинофілів і кількістю моноцитів лімфоцитів і рЕ-РУЛ. Прямий сильний зв'язок виявлений також між здатністю до утворення формазану пулом фагоцитів (моноцитів, ПЯЛ) і рівнем субпопуляцій тЕ-, бЕ-, ауто-РУЛ, а також рЕ- і сЕ-РУЛ. При цьому відзначена тенденція до зворотнього зв'язку середньої і слабкої сили між утворенням формазана фагоцитами і рівнем вЕ-РУЛ.

Таблиця 3 - Аналіз взаємозв'язків деяких вивчених показників у хворих з БА

Показники	Еозинофіли, %	Еозинофіли, 10^9/л	Паличкоядерні еозинофіли,%	Моноцити,%	Моноцити,10^9/л	Лімфоцити,%	Лімфоцити,10^9/л	Утворення формазану 1 моноцитом	Утворення формазану 1 пул	Утворення формазану пулом	Утворення формазану пулом ПЯЛ	рЕ-РУЛ, %	рЕ-РУЛ, 10^9/л	% морул рЕ-РУЛ	сЕ-РУЛ, %	сЕ-РУЛ, 10^9/л	% морул сЕ-РУЛ	тЕ-РУЛ, %	тЕ-РУЛ, 10^9/л	бЕ-РУЛ, %	ауто-РУЛ, 10^9/л	вЕ-РУЛ, %	вЕ-РУЛ, 10^9/л
№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2																							
3																							
4																							
5			0,81																				
6			0,74																				
7			0,58		0,69																		
8																							
9																							
10		0,61																					
11			0,76				0,66																
12	0,63	0,69																					
13		0,70			0,60		0,97				0,58												
14																							
15					0,60						0,72												
16			0,61	0,61	0,82		0,86				0,86		0,82										
17									0,69	0,60													
18	0,67	0,72								0,84		0,66											
19		0,72					0,97						0,98										
20		0,62						0,73		0,75		0,73											
21							0,70			0,68			0,76										
22								-0,23	-0,29	-0,31	-0,24												
23								-0,08	-0,57	-0,13													

Прямо, сильно зв'язаний вміст рЕ-РУЛ з рівнем сЕ-, бЕ- і ауто-РУЛ. Взаємозв'язок еозинофілів і субпопуляцій Т-лімфоцитів підтверджує висловлене раніше припущення, що серед активованих Т-лімфоцитів переважають Тх2. Взаємозв'язок між рівнем моноцитів і вмістом лімфоцитів, а також сЕ- і рЕ-РУЛ, відбиває очевидно, участь їх у формуванні системи імунного захисту у легенях. Відомий вплив продуктів неферментативного ПО на проліферацію клітин [1,3,22]. Сильний зв'язок між здатністтю пула фагоцитів до утворення формазана і рівнем субпопуляцій Т-лімфоцитів, можна пояснити можливим стимулюючим впливом $\cdot O_2^-$ на лимфопоез Т-лімфоцитів. Збільшення загального вмісту Т-лімфоцитів, поява активованих (армованих) Т-лімфоцитів, з переважною активацією Т-лімфоцитів з хелперной функцією – ознаки активації имуногенезу. Посилення лимфопоезу проявляється надходженням у циркуляцію значної кількості малодиференційованих Т-лімфоцитів.

Таким чином у роботі показано, що в нормі до генерації $\cdot O_2^-$ здатні ПЯЛ і моноцити, при БА продукція $\cdot O_2^-$ фагоцитами різко зростає, при цьому основним у генерації ВР є пул ПЯЛ. Відзначено високий рівень СД2-залежної адгезії Т-лімфоцитів при БА з активацією субпопуляцій тЕ-, бЕ-, сЕ-, рЕ- і ауто-РУЛ. Виявлено сильний прямий взаємовплив між генерацією $\cdot O_2^-$ фагоцитами і рівнем субпопуляцій тЕ-, бЕ- сЕ-, рЕ-, ауто-РУЛ і експресією СД2-рецепторів на Т-лімфоцитах серед субпопуляцій тЕ-, сЕ- та рЕ-РУЛ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно – антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К., 1997.
2. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. И др. Основы биохимии. –Т.1. –М., 1981.
3. Воскресенский О.Н., Жутаев И.А., Бобырев В.Н. и др Антиоксидантная система, онтогенез и статение// Вопросы мед. химии. –1982. –№1. –С. 14 –27.
4. Тимочко М.Ф., Кобилінська Л.І. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль. // Медична хімі я. –1999. –№1. –С. 19 –25.
5. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. // Вестник Рос. АМН. –1998. –№7. –С. 43 –51.
6. Токмаков А.А., Васильев В.Ю. Исследование роли активных форм кислорода в индукции люминолзависимой хемилюминесценции макрофагов // Биохимия. –1991. –Т.56, вып.2. –С. 250 – 257.
7. Грилевски Р.Е. Участие свободных раликалов в преображениях эндотелиального простациклина и окиси азота. // Новости фармации и медицины. –1997. –№1-2. –С 2 -8.
8. Игнатьева В.А. Иммунная система и патология. // Пат. физиология и экспериментальная терапия. –1997. –№4. –С. 26 –37.
9. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. –Новосибирск, 1989
10. Ярилин А.А. Основы иммунологии.- М., 1999.
11. Лозовой В.П., Кожевников В.С., Волчек И.А. Методы исследование Т-системы иммунитета в диагностике вторичных иммунодефицитов при заболеваниях и повреждениях. –Томск, 1986.
12. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / под ред. Дж. Натвига. –М., 1980.
13. Гробова О. М., Воронина Л.М. Метод обработки бронхоальвеолярных смывов для проведения цитохимического исследования при хроническом неспецифическим воспалением легких // Архив патологии. –1990. –№11. –С. 62 –63.
14. Смирнов С.В., Сухарев С.А., Шадрин Б.П. Ингибирование нормальной сывороткой крови восстановления НСТ фагоцитирующими клетками. // Иммунология. –1989. –№6. –С. 35 –39.
15. Гусев В.А., Даниловская Е.В. Роль активных форм кислорода в патогенезе пневмокониозов. // Вопросы мед. химии. –1987. –№5 –С. 9 –15.
16. Гордиенко С.М. Сравнительная оценка результатов теста восстановления НСТ при микроскопическом и спектрофотометрическом вариантах метода с различными солями тетразолия // Лаб. дело. –1983. –№2. –С. 21 –24.
17. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. –Л., 1973.
18. Поляков И.В., Соколова Н.С. Практическое руководство по медицинской статистике. –Л., 1975.
19. Свободные радикалы в биологии. / Под ред. У. Прайора. –Ч.1. –М., 1979.
20. Скороход Н.І. Корекція метаболічних процесів у хворих на бранхіальну астму : вільнорадикальні аспекти // Практична медицина. –1998. –№5-6. –С. 76 –79.
21. Польнер А.А., Минин Д.С., Польнер С.А. Роль молекул адгезии в аллергическом воспалении при бронхиальной астме и других заболеваниях // Иммунология.- 1998.- №2.- С. 13 -17.
22. Афонина Г.Б., Бодонос В.Г. Роль свободнорадикального окисления мембранных липидов лимфоцитов в развитии иммунологической недостаточности и ее коррекция токоферолом // Иммунология. –1990. –№5. –С. 33 –35