

DOI 10.29254/2077-4214-2017-4-3-141-328-331

УДК: 616.1/.4-003.96-08

¹Акімова В. М., ²Лаповець Н. Є., ¹Лаповець Л. Є.

ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ АКТИВАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ НА ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ РІЗНИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ОРГАНІВ ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ

¹Національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

²ДУ «Львівський науково-дослідний інститут епідеміології і гігієни МОЗ України» (м. Львів)

natla@ukr.net

Робота є фрагментом планової НДР «Розробка диференційної тактики лікування і профілактики моно- і поліорганної недостатності в ургентній абдомінальній хірургії» № державної реєстрації 011U002149, шифр теми ІН.2100.0002.10.

Вступ. В контексті з сучасною концепцією про системне запалення про роль імунної системи [1,2,4] значення імунологічних досліджень для хворих з гострою запальною абдомінальною патологією значно зростає, оскільки дозволяє провести більш точну диференційну діагностику та, враховуючи особливості функціонального стану імунітету, скоригувати тактику лікування.

Збалансованість імунної відповіді при запаленні залежить від основних фізіологічних процесів в імунній системі: проліферації та диференціації пула імунокомпетентних клітин. Тому одним із перспективних підходів до встановлення функціонального стану імунної системи є аналіз активаційного профілю лімфоцитів на підставі вивчення експресії активаційних маркерів.

Активаційні антигени можна поділити на дві групи: активаційні антигени диференціювального характеру (CD25⁺, CD95⁺, CD71⁺, HLA-DR) та функціональні активаційні антигени (CD23⁺) [6,10]. Аналіз активаційного профілю лімфоцитів крові є показовим для оцінки інтенсивності імунної реакції на пошкоджуючий фактор при гострому запаленні [7,9]. Апоптоз відіграє важливу роль в елімінації аутореактивних клітин, контролює тривалість, інтенсивність імунної відповіді, ступінь пошкодження тканин і є механізмом, який підтримує баланс лімфоїдних клітин в організмі [3,5,6]. Вивчення процесів активації при патології має значення для встановлення особливостей патогенезу абдомінального запалення і має важливий прогностичний характер. Покращення диференційної діагностики запальних захворювань у черевній порожнині дасть можливість зменшити кількість негативних апендектомій, які створюють непотрібні ризики та затрати коштів як для пацієнта, так і для лікуючої установи [2,8].

Метою даного дослідження було визначити експресію активаційних маркерів на лімфоцитах периферичної крові у хворих на гострі запальні процеси

черевної порожнини в залежності від форми запалення.

Об'єкт і методи дослідження. Було обстежено 36 практично здорових осіб та 109 осіб віком 18-65 років, які поступили до лікувального закладу з гострим абдомінальним болем. До I групи порівняння ввійшла 21 особа з гострим катаральним апендицитом (ГКА); до II групи (n=40) ввійшли хворі на гострий флегмонозний апендицит (ГФА); до III групи (n=20) – хворі на гострий гангренозний апендицит (ГГА). До IV групи (n=30) – хворі на гострий апендицит, ускладнений апендикулярним інфільтратом (AI) віком. Групи для аналізу результатів досліджень формували після оперативного втручання на підставі патоморфологічного заключення. Забір крові для досліджень проводили з ліктьової вени при поступленні хворого з гострим абдомінальним болем у лікувальний заклад до оперативного втручання. Фенотиповий склад лімфоцитів вивчали непрямим імунофлюорисцентним методом з використанням моноклональних антитіл до диференціювальних антигенів лімфоцитів: CD3⁺ (Т-лімфоцити), CD4⁺ (Т-хелпери), CD8⁺ (Т-кілери/цитотоксичні), CD19⁺ (В-лімфоцити), CD56⁺ (NK клітини), CD23⁺ (активовані В-лімфоцити, низькоафінний рецептор до IgE), CD95⁺ (маркер апоптозу), CD25⁺ (активовані Т-лімфоцити, рецептор до ІL-2) в реакції непрямой імунофлюоресценції з антитілами міченими ФІТЦ («Сорбент», Росія) [5]. Розраховували індекси: співвідношення між різними популяціями лімфоцитів, елімінаційний індекс (EI) ((T+B)/CD95⁺), індекс проліферації (ІП) ((T+B)/CD25⁺).

Для статистичної обробки матеріалу використовували комп'ютерний пакет програм Statistica 2006 із застосуванням методів параметричної (варіаційної) статистики з додержанням умов щодо оцінки типу розподілу. Результати представлені у вигляді середнього статистичного значення показника та помилки середнього $M \pm m$. Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента (t) та Манна-Уїтні.

Результати досліджень та їх обговорення. Для виявлення особливостей реакції специфічної ланки імунітету на виникнення запального процесу в черевній порожнині проведено дослідження фенотипово-

го складу лімфоцитів периферичної крові (табл. 1). У результаті проведених досліджень показано, що у хворих на ГФА абсолютна кількість лімфоцитів (ЛЦ) крові знижена на 10%, а у групі з апендикулярним інфільтратом на 14,5% порівняно з контролем ($p < 0,05$).

У інших групах цей показник не відрізнявся від контрольного значення. Виявлено перерозподіл всередині популяції лімфоцитів. Так у групі з ГКА на 28% нижчий рівень Т-лімфоцитів за рахунок зниження кількості Т-хелперів (на 36,5%), у той час, як кількість Т-цитотоксичних/супресорів підвищена у 1,8 рази порівняно з контролем. Відповідно знижений ІРІ на 10% (табл. 2).

При ускладнених та деструктивних формах гострого апендициту Т-клітинний імунodefіцит виражений у групі з ГФА та АІ, де рівень Т-лімфоцитів нижчий на 37% порівняно з контролем. Знижена також абсолютна кількість циркулюючих Т-хелперів на 46% у групі ГФА, на 33% у групі ГГА, на 47% у групі з АІ ($p < 0,05$).

Індекси лімфоцитів периферичної крові хворих на гострі запальні процеси у черевній порожнині, М±m

Групи	Контроль, n=30	ГКА, n=21	ГФА, n=41	ГГА, n=27	АІ, n=20
Т-Лц/В-Лц	2,61±0,02	1,91±0,02*	1,88±0,10*	1,87±0,05*	2,05±0,15#
CD19 ⁺ /CD23 ⁺	3,59±0,22	1,30±0,05*	1,28±0,01*	1,24±0,03*	1,28±0,12*
CD25 ⁺ /CD95 ⁺	1,48±0,02	1,14±0,12	0,53±0,01*	0,65±0,02*	0,81±0,04*
ІРІ	1,45±0,02	1,32±0,12*	1,34±0,05	1,47±0,08	1,17±0,03*
ЕІ	11,52±0,28	4,02±0,21*	3,21±0,25*	3,59±0,23*	3,21±0,19*
ПІ	7,90±0,55	3,54±0,21*	6,01±0,45*	4,81±0,32**	3,91±0,21*

Примітки: * – вірогідність відмінності показників порівняно з показниками контролю ($p < 0,05$); # – вірогідність відмінності порівняно з ГКА ($p < 0,05$); ^ – вірогідність відмінності порівняно з групою ГФА ($p < 0,05$).

Відповідно підвищений рівень Т-цитотоксичних/супресорів і знижений ІРІ. Найбільш виражене зниження співвідношення ІРІ у групі з АІ на 20%. Таким чином у хворих на гострий апендицит при поступленні у лікувальний заклад спостерігається перерозподіл між регуляторними та ефекторними субпопуляціями лімфоцитів: зниження кількості Т-хелперів та збільшення кількості Т-цитотоксичних/супресорів найбільш виражений при ГФА та при АІ.

Одночасно відбувається активація гуморальної ланки імунітету, що виражено у підвищенні кількості В-лімфоцитів. У групі з ГКА кількість циркулюючих В-лімфоцитів на 48,5% більша, у групі ГГА на 57% більша від контролю. Відповідно знижується спів-

відношення Т-лімфоцитів до В-лімфоцитів порівняно з контролем.

Активність ефекторної ланки виражається у збільшенні кількості NK-клітин у 2,9 рази відносно контролю у групі з ГКА; у 2,7 рази у групі з ГФА, у 3 рази у групі з ГГА, у 2,5 рази у групі з АІ ($p < 0,05$).

Таблиця 1.

Абсолютна кількість лімфоцитів (Г/л) різних субпопуляцій у периферичній крові хворих на гострі запальні процеси у черевній порожнині, М±m.

Групи Показники	Контроль, n=30	ГКА, n=21	ГФА, n=41	ГГА, n=27	АІ, n=20
ЛЦ	2,0±0,08	1,93±0,22	1,79±0,02*	2,06±0,03	1,71±0,22
CD3 ⁺	1,44±0,03	1,04±0,13*	0,91±0,08*#	1,05±	0,91±0,14*#&
CD4 ⁺	0,93±0,05	0,59±0,09*	0,50±0,04*	0,62±	0,49±0,07*
CD8 ⁺	0,25±0,02	0,45±0,05*	0,39±0,03*	0,43±	0,42±0,04*
CD19 ⁺	0,35±0,03	0,52±0,05*	0,49±0,03*	0,55±0,04*	0,43±0,03**
CD56 ⁺	0,15±0,01	0,44±0,03*	0,41±0,04*	0,46±	0,37±0,02*

Примітка: * – вірогідність відмінності показників порівняно з показниками контролю ($p < 0,05$); # – вірогідність відмінності порівняно з ГКА ($p < 0,05$); ^ – вірогідність відмінності порівняно з групою ГФА ($p < 0,05$); & – вірогідність відмінності порівняно з групою ГГА ($p < 0,05$).

Таблиця 2.

Ефективність розвитку імунної відповіді залежить від ступеню активації лімфоцитів. Основним цитокином-регулятором проліферації лімфоцитів є ІЛ-2, який діє через рецептор до ІЛ-2. CD25⁺ (α-субодиниця рецептора для ІЛ-2) – експресується на поверхні активованих Т-, В-лімфоцитів і макрофагів і є ознакою готовності лімфоцитів до проліферації та диференціації. Аналіз активаційних процесів показує, що для гострого абдомінального запалення флегмонозного та гангренозного характеру характерний невисокий приріст рівня в периферичній крові лімфоцитів, які експресують маркер ранньої активації CD25⁺ (у 1,6

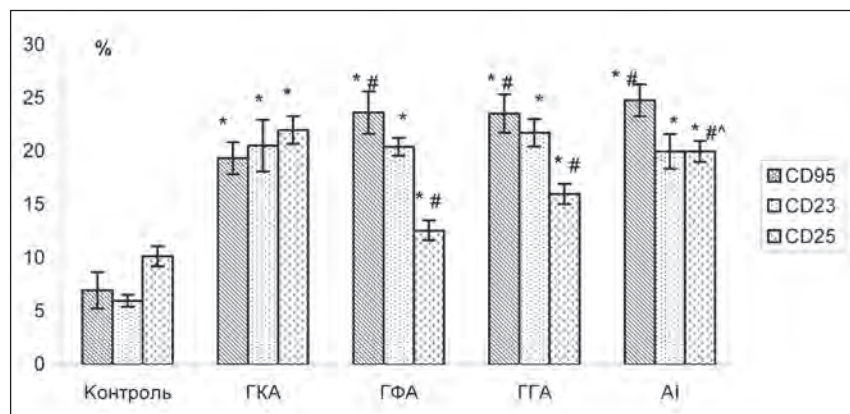


Рис. Експресія маркерів активації на лімфоцитах периферичної крові хворих на гострі запальні процеси у черевній порожнині.

Примітки: * – вірогідність відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$);

– вірогідність відмінності порівняно з ГКА ($p < 0,05$); ^ – вірогідність відмінності порівняно з групою ГФА ($p < 0,05$).

рази для ГГА та у 1,3 рази для ГФА), у той час, як при АІ рівень вищий у 2 рази, а при ГКА у 2,2 рази порівняно з контролем (**рис.**). Не виявлено вірогідної різниці між групами ГГА та ГФА.

CD95⁺ (Fas-антиген) є пізнім маркером активації. Його експресія свідчить про готовність клітини до завершення клітинного циклу, до апоптозу. Аналіз рівня експресії CD95⁺ на лімфоцитах крові показав, що при гангренозній та флегмонозній формі запалення та при АІ виявлено підвищення більше ніж у 3 рази порівняно з контролем кількості CD95⁺лімфоцитів. У групі з ГКА CD95⁺лімфоцити склали 19,36±1,58% від усіх лімфоцитів, що було у 2,7 рази більше порівняно з контролем (7,0±0,42%).

З функціональних активаційних антигенів вивчали експресію на лімфоцитах CD23⁺ (низькоафінний рецептор до IgE), який є маркером активації В-лімфоцитів, експресія якого регулюється IgE та ІЛ-4. При гострих деструктивних абдомінальних запальних процесах, при ускладненні гострого апендициту апендикулярним інфільтратом встановлено високі рівні CD23⁺лімфоцитів, які перевищують показник норми більш ніж у 3 рази, що може бути свідченням наявності алергічного компонента при абдомінальному запаленні.

Аналізуючи активаційні профілі лімфоцитів периферичної крові при різних патоморфологічних формах інтраабдомінального запалення (**рис.**) можна зробити висновок, що при гострому запаленні переважає експресія антигену CD25⁺, який є раннім активаційним маркером проліферації лімфоцитів, над експресією рецептора Fas-залежного апоптозу (CD95⁺). При гнійних та гнильних запальних проце-

сах навпаки, що також підтверджують вищі значення індексу ПІ та нижчі значення індексу ЕІ порівняно з групою ГКА та АІ, та знижене співвідношення CD25⁺/CD95⁺. Отримані результати дозволяють зробити припущення, що експресія CD23⁺ на лімфоцитах крові не є патогномонічною ознакою тільки для атопічних процесів, а швидше є показником високої активності запалення і його деструктивного характеру. Таким чином, вивчення особливостей імунної відповіді та активаційних процесів при різних формах абдомінального запалення дозволить розробити патогенетично обґрунтовану терапію з урахуванням особливостей функціонування імунної системи і підвищити ефективність лікування гострого апендициту.

Висновки

1. При деструктивних формах гострого апендициту спостерігається формування Т-клітинного імунodefіцитного стану та активація гуморальної і клірної ланки імунітету.

2. При різних патоморфологічних формах гострого апендициту спостерігається підвищення експресії CD23⁺ на лімфоцитах периферичної крові, що є свідченням розвитку гіперчутливості І типу.

3. У хворих на деструктивні форми гострого апендициту переважають процеси активації апоптозу над проліферацією лімфоцитів, про що свідчить переважання експресії CD95⁺ на експресію CD25⁺ порівняно з групою контролю та з незмінним червоподібним відростком.

Перспективи подальших досліджень. Планується досліджувати особливості цитокінової регуляції активаційних процесів лімфоцитів за умов гострого абдомінального запалення.

Література

1. GusevYe.Yu. Sistemnoyevospaleniye: teoreticheskiyeimethodologicheskiiyepodkhodykopisaniyumodeliobshchepatologicheskogo protsesssa. Chast' 3. Predposylki nesindromal'nogo podkhoda / Ye.Yu. Gusev, V.A. Chereshev // Patologicheskaya fiziologiya i eksperemental'naya terapiya. – 2013. – № 3. – S. 3-14.
2. Dolgushina A.I. Immunnyy status patsiyentov pozhilogo i starcheskogo vozrasta s khronicheskimi zabolevaniyami organov pishchevareniya v sochetanii s aterosklerozom v basseynе bryushnoy aorty / A.I. Dolgushina // Ateroskleroz i dislipidemii. – 2014. – № 3. – S. 21-27.
3. Ketlinskiy S.A. Rol' T-khelperov 1 i 2 v regulyatsii kletochnogo i gumoral'nogo immuniteta / S.A. Ketlinskiy // Immunologiya. – 2002. – № 2. – S. 77-79.
4. Osobennosti immunного vospaleniya u bol'nykh s khronicheskoy obstruktivnoy bolezn'yu legkikh i bronkhial'noy astmoy / A.Ye. Shuganov, F.N. Paleve [i dr.] // Arkhiv vnutrenney meditsinyu. – 2015. – № 3 (23). – S. 56-62.
5. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi / L.Ye. Lapovets', B.D. Lutsyk, H.B. Lebed' [ta in.]. – L'viv, 2014. – 290 s.
6. Poryadin G.V. Molekulyarnyye i kletochnyye mekhanizmy immunopatologii: sostoyaniye problemy i perspektivy issledovaniy / G.V. Poryadin // Vrachebnoye delo. – 2008. – № 3. – S. 3-13.
7. Differential T cell-mediated regulation of CD23⁺ B cells and follicular dendritic cells / S. Sukumar, D. Conrad, A.K. Szakal, J.G. Tew // The Journal of Immunology. – 2006. – Vol. 176. – P. 4811-4817; doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4811.
8. Negative appendectomy: a 10-year review of a nationally representative sample / S.A. Seetahal, O.B. Bolorunduro [et al.] // Am J Surg. – 2011. – (201). – P. 433-437.
9. Obar J.J. CD4⁺ T cell regulation of CD25⁺ expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses / J.J. Obar, M.J. Molloy, E.R. Jellison // PNAS. – 2010. – Vol. 107, № 1. – P. 193-198; www.pnas.org/cgi/content/full/0909945107/DCSupplemental.
10. The structure of human CD23⁺ and its interactions with IgE and CD21⁺ / R.G. Hibbert, P. Teriete, G.J. Grundi, R. Beavil [et al.] // Journal of experimental Medicine. – 2005. – Vol. 202, № 6. – P. 750-761.

ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ АКТИВАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ НА ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ РІЗНИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ОРГАНІВ ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ

Акімова В. М., Лаповець Н. Є., Лаповець Л. Є.

Резюме. Проведено дослідження експресії маркера ранньої активації CD25⁺, маркера функціональної активації CD23⁺ та пізньої активації CD95⁺ на лімфоцитах периферичної крові у 68 хворих на деструктивні форми гострого апендициту, 20 хворих з апендикулярним інфільтратом, 21 хворого з гострим катаральним апендицитом та у 30 практично здорових осіб. Встановлено, що при деструктивних формах гострого апендициту спостерігається формування Т-клітинного імунodefіцитного стану та активація гуморальної і клірної ланки

імунітету; підвищення експресії CD23⁺ на лімфоцитах периферичної крові, що свідчить про розвиток гіперчутливості I типу. У хворих на деструктивні форми гострого апендициту переважають процеси активації апоптозу над проліферацією лімфоцитів, про що свідчить переважає експресії CD95⁺ на експресією CD25⁺ порівняно з групою контролю та з незмінним апендиксом.

Ключові слова: гострий флегмонозний апендицит, гострий гангренозний апендицит, CD25⁺, CD23⁺, CD95⁺, лімфоцити.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗА НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ОРГАНОВ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Акимова В. Н., Лаповец Н. Е., Лаповец Л. Е.

Резюме. Проведено исследование экспрессии маркера ранней активации CD25⁺, маркера функциональной активации CD23⁺ и поздней активации CD95⁺ на лимфоцитах периферической крови у 68 больных деструктивными формами острого аппендицита, 20 больных с аппендикулярным инфильтратом, 21 больного с острым катаральным аппендицитом и у 30 практически здоровых лиц. Установлено, что при деструктивных формах острого аппендицита наблюдается формирование Т-клеточного иммунодефицита и активация гуморального и киллерного звена иммунитета; повышение экспрессии CD23⁺ на лимфоцитах периферической крови, что свидетельствует о развитии гиперчувствительности I типа. У больных деструктивными формами острого аппендицита доминируют процессы активации апоптоза над пролиферацией лимфоцитов, о чем свидетельствует преобладание экспрессии CD95⁺ над экспрессией CD25⁺ сравнительно с группой контроля с неизменным апендиксом.

Ключевые слова: острый флегмонозный аппендицит, острый гангренозный аппендицит, CD25⁺, CD23⁺, CD95⁺, лимфоциты.

EXPRESSION OF ACTIVATION AND APOPTOSIS MARKERS ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN DIFFERENT STAGES OF PURULENT-INFLAMMATORY PROCESS DEVELOPMENT IN ABDOMINAL CAVITY ORGANS

Akimova V. M., Lapovets N. E., Lapovets L. E.

Abstract. The clinic has an urgent differential diagnosis of acute abdominal diseases that require conservative or urgent surgical treatment. An analysis of the activation profile of blood lymphocytes can be used to assess the state of the immune system and the intensity of the immune response.

Objective. To investigate the expression of activation markers on peripheral blood lymphocytes in patients with acute inflammation of the abdominal cavity.

Object and methods. We conducted a study on the expression of early activation CD25⁺ marker, functional activation CD23⁺ marker and late activation CD95⁺ marker on peripheral blood lymphocytes in 68 patients with destructive forms of acute appendicitis, 20 patients with appendicular infiltrate, 21 patients with acute catarrhal appendicitis (ACA), and in 30 virtually healthy persons by the method of indirect immuno-fluorescence.

Results and discussion. We have shown that in patients with acute phlegmonous appendicitis (APA), the absolute number of lymphocytes (LC) of blood is reduced by 10%, and in the group with appendicular infiltrate by 14.5% compared with the control ($p < 0.05$). In complicated and destructive forms of acute appendicitis, T-cell immunodeficiency is expressed in the group with APA and appendicular infiltrate (AI), where the level of T-lymphocytes is lower by 37% compared with control. There also reduced the absolute number of circulating T-helper cells by 46% in the APA, 33% in those with acute gangrenous appendicitis (AGA), 47% in the group with AI ($p < 0.05$). At the same time, the activation of humoral immunity is manifested in the increase of B-lymphocytes number. In the group with ACA, the number of circulating B-lymphocytes is 48.5% higher and in the AGA group 57% greater than control. The activity of the effector unit is expressed in an increase of NK-cells number in 2.9 times relative to control in the group with ACA; in 2.7 times in the group with APA, 3 times in the group with AGA, 2.5 times in the group with AI ($p < 0.05$). The analysis of activation processes shows an increase in the level of peripheral blood of lymphocytes expressing early activation CD25⁺ marker (1.6 times for AGA and 1.3 times for APA), while at AI level is higher 2 times, and with ACA 2.2 times compared with control. An analysis of the expression CD95⁺ level on blood lymphocytes showed that an increase in gangrenous and phlegmonous form of inflammation and in AI was more than 3 times compared with the control of the number of CD95⁺ lymphocytes. In the group with ACA, CD95⁺ lymphocytes were $19.36 \pm 1.58\%$ of all lymphocytes, which was 2.7 times more than control ($7.0 \pm 0.42\%$). In acute destructive abdominal inflammatory processes, with the complication of acute appendicitis appendicular infiltrate, high levels of CD23⁺ lymphocytes are found that exceed the norm more than 3 times, which may be evidence of the presence of an allergic component in abdominal inflammation.

Conclusion. It was established that in the destructive forms of acute appendicitis, the formation of the T-cell immunodeficiency state and activation of the humoral and killer units of immunity and increased expression of CD23⁺ on peripheral blood lymphocytes are observed. This indicates the development of hypersensitivity Type I. In patients with destructive forms of acute appendicitis processes of activation of apoptosis over the proliferation of lymphocytes prevail. This is evidenced by the predominance of CD95⁺ expression on the expression of CD25⁺ compared with the control group and with unchanged appendix.

Keywords: acute phlegmonous appendicitis, acute gangrenous appendicitis, CD25⁺, CD23⁺, CD95⁺, lymphocytes.

*Рецензент – проф. Старченко І. І.
Стаття надійшла 13.11.2017 року*