



Роль цитотоксических лимфоцитов в воспалении у больных хронической обструктивной болезнью легких в стадиях обострения и ремиссии

Распопина Н.А. • Шуганов Е.Г. • Палеев Ф.Н. • Салмаси Ж.М. • Шуганов А.Е.

Распопина Наталья Автандиловна – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры внутренних, профессиональных заболеваний и пульмонологии¹

Шуганов Евгений Григорьевич – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей²

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–9, Российская Федерация.
Тел.: +7 (909) 988 34 55.

E-mail: shuganov.evgeny@yandex.ru

Палеев Филипп Николаевич – д-р мед. наук, профессор, директор²

Салмаси Жан Мустафаевич – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии³

Шуганов Александр Евгеньевич – аспирант кафедры терапии факультета усовершенствования врачей²

Актуальность. Несмотря на огромное количество публикаций, посвященных изучению экспрессии поверхностных антигенов лимфоцитов периферической крови при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), до сих пор не разработан алгоритм, позволяющий однозначно интерпретировать получаемые результаты и найти патогенетически обоснованное лечение.

Цель – оценить роль цитотоксических лимфоцитов в поддержании воспаления при ХОБЛ.

Материал и методы. Состояние иммунной системы исследовали на примере содержания в крови цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток у 37 больных ХОБЛ среднетяжелого течения на стадиях обострения и ремиссии и у 24 здоровых доноров, составивших группу сравнения. Методами непрямой иммунофлюоресценции определяли относительное и абсолютное содержание в крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD54, CD71, CD72, HLA-DR, CD95, мембранные иммуноглобулины M (mIgM) и G (mIgG).

Результаты. 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 увеличивалось количество CD4, CD8, CD20, CD72, NK-клеток, mIgM и mIgG, вне обострения нормализовался уровень CD20 и CD72, однако количество остальных цитотоксических клеток оставалось высоким, что поддерживало воспаление и прогрессирующее повреждение ткани легких и бронхов.

Заключение. Выявленные изменения, по-видимому, являются отражением чрезмерной стимуляции Т-клеточного звена иммунной системы у больных ХОБЛ в периоды как обострения, так и ремиссии, а относительное снижение общего количества Т-лимфоцитов свидетельствует о неспецифическом, то есть неинфекционном воспалительном процессе у этих пациентов. Высокий цитотоксический потенциал иммунной системы, который и вызывает повреждение легочной ткани, способствует развитию пневмосклероза и эмфиземы.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, иммунное воспаление легочной ткани и бронхов, цитотоксические лимфоциты.

¹ ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

³ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – 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 патогенных агентов [1]. В ответ на раздражители, например, сигаретный дым, в воздухоносных путях развивается воспаление, при котором наблюдается увеличение количества нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов CD8⁺, а также концентрации многих медиаторов воспаления [2].

Известно, что любое хроническое заболевание имеет периоды обострения и ремиссии. Так, при обострении бронхиальной астмы активность воспалительного процесса повышается, а в период ремиссии существенно снижается, что проявляется уменьшением числа клеток воспаления и количества цитотоксических медиаторов. Ремиссия бронхиальной астмы замедляет или даже останавливает прогрессирование болезни [3]. Однако при ХОБЛ, как показывают наблюдения, остановить прогрессирование процесса практически невозможно, вследствие чего происходит постоянное ухудшение бронхиальной проходимости [4, 5]. В последние годы появился ряд публикаций, в которых подчеркивается важная роль цитотоксических лимфоцитов в патогенезе ХОБЛ, однако результаты проведенных исследований неоднозначны [5, 6, 7].

Цель исследования – оценить состояние иммунной системы у больных ХОБЛ в стадиях 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).

Материал и методы

В исследование были включены 37 мужчин, страдающих ХОБЛ среднетяжелого течения (II стадия), в возрасте от 50 до 75 лет (средний возраст $58,1 \pm 1,6$ года). Все пациенты с ХОБЛ имели индекс курения не менее 20 пачка-лет, у них отсутствовали данные о наличии атопии и бронхиальной астмы в анамнезе. Контрольную группу составили практически здоровые люди в возрасте от 36 до 56 лет (20 мужчин и 4 женщины, средний возраст $52,6 \pm 2,8$ года) [8].

У больных ХОБЛ забор крови проводили в период обострения заболевания до назначения системных глюкокортикостероидов и/или антибиотиков и при клинически стабильном состоянии в течение последующих 4 недель.

Оценка функции внешнего дыхания проводилась согласно протоколу «Стандартизация легочных функциональных тестов» Европейского респираторного общества с помощью спирометрии на аппарате компьютерного пневмотахографа Custo Vit (Австрия). Оценивались показатели: объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) и ОФВ1/ФЖЕЛ, а также величина сопротивления дыхательных путей (комплексный показатель бронхиальной обструкции, не зависящий от способности пациента выполнять дыхательный маневр).

Определяли относительное и абсолютное содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD56, CD72, мембранные иммуноглобулины M (mIgM) и G (mIgG) с помощью моноклональных антител ЛТ и ИКО (Россия) в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Подробно методика описана в наших предыдущих работах [8, 9]. В качестве вспомогательных методов проводилось выделение лимфоцитов седиментацией в градиенте плотности фиколл-верографии по методу Бойума, а также оценка жизнеспособности лимфоцитов сразу после выделения из крови и подсчета их абсолютного числа в периферической крови по критериям Фримеля [10].

Статистическую обработку полученных результатов для оценки достоверности регистрируемых изменений проводили при большой выборке с помощью t-критерия Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов – с применением непараметрического критерия Уилкоксона – Манна – Уитни. Расчеты проводили на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ Statistica.

Результаты и обсуждение

При анализе полученных характеристик иммунных изменений при ХОБЛ особое пристальное внимание было уделено представительству в периферической крови трех основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-клеток, а также субпопуляции 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 ассоциированной с мембранами структуры – антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TcR/CD3), обеспечивающей запуск процессов антигензависимой активации Т-клетки [2]. Молекулы CD4 и CD8, распознающие структурные детерминанты антигенов соответственно 2-го и 1-го классов главного комплекса гистосовместимости, обеспечивают процесс иммунологического ограничения. Они способны самостоятельно, без участия TcR/CD3, передавать активирующий Т-клетку сигнал [1]. И, наконец, несмотря на известные ограничения, антигены CD3, CD4 и CD8 остаются маркерами, широко используемыми для количественной оценки всей популяции Т-клеток (CD3), хелперно-индукторной (CD4) и супрессорно-цитотоксической (CD8) субпопуляций Т-лимфоцитов [3, 10].

По мнению многих исследователей, изучение Т-клеточного звена иммунной системы позволяет выявлять нарушение соотношения хелперных и цитотоксических лимфоцитов [11].

В результате проведенного исследования оказалось, что у больных ХОБЛ независимо от стадии заболевания было существенное увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов ($p < 0,001$). При этом в стадии ремиссии наблюдалось также снижение содержания в крови Т-лимфоцитов (до $52,28 \pm 2,27\%$) по сравнению со здоровыми людьми и 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 (рис. 1).

Что касается NK-клеток, то представители этой популяции лимфоцитов первыми настраиваются на защиту организма против чужеродных и измененных клеток. От основных популяций лимфоцитов NK-клетки также отличаются 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.

Нами выявлено выраженное увеличение количества NK-клеток в крови больных ХОБЛ ($p < 0,0001$) по сравнению со здоровыми пациентами (рис. 2). Предположительно, резкое повышение содержания NK-клеток при ХОБЛ связано с увеличением концентрации интерферона- γ в крови больных с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания [6].

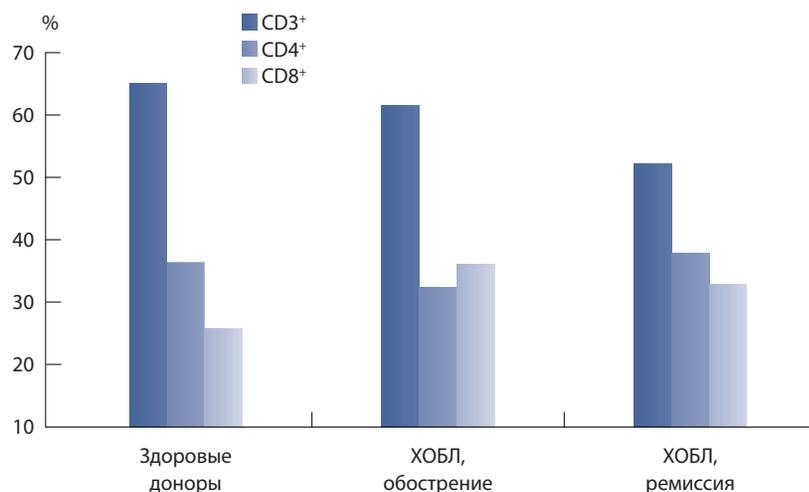


Рис. 1. Содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания по сравнению с контролем; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

Не менее важным представляется изучение В-клеточного звена иммунной системы, основанное на выявлении различных маркеров В-лимфоцитов. По своим функциональным свойствам В-лимфоциты предназначены для реализации реакций гуморального иммунитета посредством выработки специфических антител. Среди наиболее важных маркеров выделяют антигены CD20, CD72, CD38, mIgM и mIgG. CD20-антиген характеризует общее количество В-лимфоцитов. Мембранный гликопротеид CD72 обнаруживается на всех В-лимфоцитах в периферической крови и в костном мозге, исключая плазматические клетки [6]. Биологическая роль CD72-антигена

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания, %

Популяции лимфоцитов	Маркеры лимфоцитов	Здоровые доноры (n=24)	Больные ХОБЛ (n=37)	
			в стадии обострения (n=22)	в стадии ремиссии (n=15)
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**

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

Данные представлены как средние значения (M) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (по сравнению со здоровыми донорами)

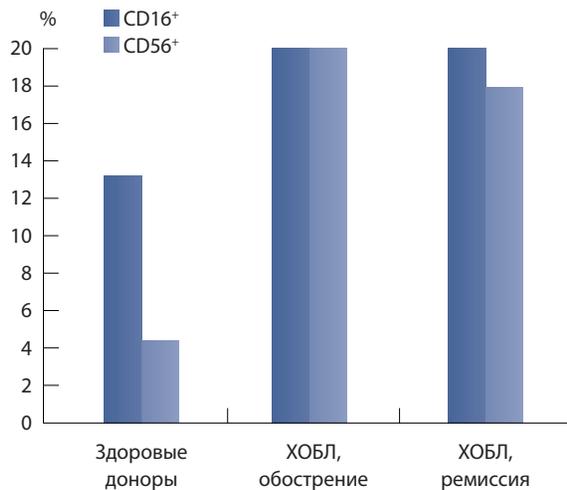


Рис. 2. Содержание NK-клеток в крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания по сравнению с контролем; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

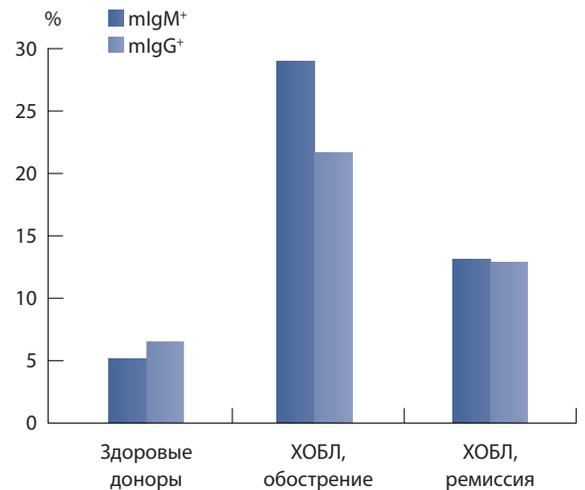


Рис. 3. Содержание зрелых В-лимфоцитов в крови больных ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания по сравнению с контролем; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

заключается в активации зрелых В-лимфоцитов [11, 12].

Исследование содержания В-лимфоцитов в периферической крови больных ХОБЛ в стадии обострения показало увеличение всех дифференцированных форм В-лимфоцитов (см. таблицу).

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 В-клетки [11, 13, 14]. Основными изотипами мембранных иммуноглобулинов являются mIgM и mIgD. Хотя mIgG представлен на небольшом количестве В-лимфоцитов, оно может увеличиваться при связывании клеток с иммуноглобулином через Fc-рецептор.

Анализ содержания в периферической крови зрелых В-клеток, несущих mIgM и mIgG, показал их существенное увеличение у больных ХОБЛ по отношению к здоровым людям, причем независимо от стадии заболевания (рис. 3). Из представленных данных 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, позволяет, 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 стадии ремиссии ХОБЛ, напротив, не отмечено достоверных изменений содержания в периферической крови общего количества В-лимфоцитов (CD20⁺), а также лимфоцитов, экспрессирующих CD72-антигены. Однако в период ремиссии, так же как и при обострении заболевания, увеличивается количество зрелых В-лимфоцитов, начавших синтез антител и экспрессирующих иммуноглобулины на клеточной мембране (mIgM⁺-лимфоциты). При этом остается высоким и содержание mIgG⁺-лимфоцитов.

Заключение

Проведенное исследование характера иммунных изменений при ХОБЛ выявило, что независимо от стадии заболевания – и в период ремиссии, и при обострении – имеет место 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, быстрому развитию эмфиземы и пневмосклероза у больных ХОБЛ. ©



Литература (References)

1. Global Initiative for Chronic Obstruction Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Updated 2011). Available from: www.goldcopd.com
2. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002;57(10):847–52.
3. Chapman KR, Boulet LP, Rea RM, Franssen E. Suboptimal asthma control: prevalence, detection and consequences in general practice. *Eur Respir J*. 2008;31(2):320–5.
4. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Román Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60(11):925–31.
5. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Domínguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev*. 2009;18(112):96–104.
6. Folli C, Chiappori A, Pellegrini M, Garelli V, Riccio AM, De Ferrari L, Braido 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.
7. Hodge G, Mukaro V, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. *Respirology*. 2013;18(2):369–76.
8. Порядин ГВ, Салмаси ЖМ, Зильбер ИЕ. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов при ХОБЛ. В: Материалы X Международного конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». Казань, 20–23 мая 2009 г. с. 304. (Poryadin GV, Salmasi ZhM, Zil'ber IE. Characteristic of surface lymphocytes phenotype in COPD. In: Proceedings of the X International Congress "Contemporary issues of allergology, immunology and immunopharmacology". 2009 May 20–23; Kazan, Russia. p. 304. Russian).
9. Порядин ГВ, Салмаси ЖМ, Макаров АИ. Механизмы регуляции экспрессии поверхностных структур дифференцированного лимфоцита. *Иммунология*. 1997;(3):4–8.
10. Фримель Г, ред. Иммунологические методы. [Перевод с нем.]. М.: Медицина; 1987. 472 с. (Friemel H, editor. Immunological working methods. Moscow: Meditsina; 1987. 472 p. Russian).
11. Fairclough L, Urbanowicz RA, Corne J, Lamb JR. Killer cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(8):533–41.
12. Howard LM, Reen DJ. CD72 ligation regulates defective naive newborn B cell responses. *Cell Immunol*. 1997;175(2):179–88.
13. Robertson MJ, Cameron C, Lazo S, Cochran KJ, Voss SD, Ritz J. Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact-dependent signals. *Nat Immun*. 1996-1997;15(5):213–26.
14. Harnett M, Rigley K. The role of G-proteins versus protein tyrosine kinases in the regulation of lymphocyte activation. *Immunol Today*. 1992;13(12):482–6.

Cytotoxic lymphocytes: the role in inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation and remission

Raspopina N.A. • Shuganov E.G. • Paleev F.N. • Salmasi Zh.M. • Shuganov A.E.

Raspopina Natal'ya Avtandilovna – MD, PhD, Professor, Internal and Occupational Diseases and Pulmonology Department¹

Shuganov Evgeniy Grigor'evich – MD, PhD, Professor, Internal Diseases Department, Postgraduate Medical School²

✉ 61/2–9 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation.
Tel.: +7 (909) 988 34 55.

E-mail: shuganov.evgeniy@yandex.ru

Paleev Filipp Nikolaevich – MD, PhD, Professor, Director²

Salmasi Zhean Mustafaeich – MD, PhD, Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology³

Shuganov Aleksandr Evgen'evich – Fellow, Internal Diseases Department, Postgraduate Medical School²

Background: Despite the number of publications related to the expression of surface antigens of periphery blood lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), algorithm for interpreting of the results and implicating pathogenetic treatments still needs to be developed.

Aim: To assess the role of cytotoxic lymphocytes in the maintaining of inflammation in COPD.

Materials and methods: To examine immune status in 37 patients with COPD exacerbation or remission and 24 healthy donors (control group), blood cytotoxic T-lymphocytes and NK-cells contents were measured using indirect immunofluorescence method. Absolute and relative numbers of lymphocytes expressing CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD54, CD71, CD72, HLA-DR, CD95 antigens, membrane immunoglobulins M (mlgM) and G (mlgG) were estimated.

Results: In COPD, significantly increased numbers of blood cytotoxic lymphocytes were

demonstrated independently from the disease stage ($p < 0.001$). During COPD exacerbation, significant elevations of CD4, CD8, CD20, CD72, NK-cells numbers, serum mlgM and mlgG were demonstrated. During remission, CD20 and CD72 content returned to normal, though, increased numbers of other cytotoxic cells persisted promoting inflammation and progressive damage of pulmonary and bronchial tissues.

Conclusion: Observed changes may be due to excessive stimulation of T-cell component of immune system in COPD patients both in exacerbation and remission. Relative reduction of total T-lymphocyte numbers indicates non-specific (non-infectious) inflammation type. High cytotoxic potential of immune system results in pulmonary damage and promotes development of pneumosclerosis and emphysema.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, immune pulmonary and bronchial inflammation, cytotoxic lymphocytes.

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

²Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova ul., Moscow, 117997, Russian Federation