

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 612.017.1:616.36-002

ВИВЧЕННЯ СТАНУ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ХВОРИХ НА ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ А

Луговськов О.Д., Козікова О.А., Жила А.В., Руденко О.А., Головчанська С.Е.

Державний заклад «Луганський державний медичний університет», Україна

Резюме. В роботі представлені результати вивчення клітин, які вступили на шлях апоптозу та експонування CD95- та CD38-рецепторів на мембранах цих клітин. Встановлено, що у хворих на ВГА зростає частка імуніцитів, які мають типові морфологічні прояви апоптозу. Під впливом амізону на цитоплазматичних мембранах моноцитів та Т-лімфоцитів пригнічувалось експонування CD38- та CD95-рецепторів апоптозу.

Ключові слова: вірусний гепатит А, апоптоз, амізон

Вступ. Апоптоз – запрограмована смерть клітин – являє собою активну форму реакції не тільки на несприятливий вплив, але і на фізіологічні, в тому числі активуючі, чинники, якими є антигени і міогени [1]. Гепатоцити особливо схильні до запрограмованої смерті у відповідь на різні типи стресів, включаючи таку інфекцію, як вірусний гепатит А (ВГА). Запрограмована смерть клітин печінки може відігравати важливу роль у розвитку холестази, біліарної атрезії, алкогольного ураження печінки, гепатоцелюлярної карциноми, гострої печінкової недостатності. Трансформуючий фактор росту β -1, активін А, фактор некрозу пухлин α (ФНП- α) та інші чинники сприяють індукції апоптозу гепатоцитів. У апоптозі клітин печінки може відігравати роль Fas-протеїн на поверхні гепатоцита. Одним із механізмів гепатотоксичності є апоптоз, опосередкований ФНП- α та Fas-протеїном [1, 2, 5, 7].

Підвищений (патологічний) апоптоз клітин імунної системи може скласти основу вторинного імунодефіциту. Морфологічні зміни імуніцитів супроводжуються гіперекспресією на їх мембранах CD95-рецепторів (Fas), що відображає готовність до реалізації специфічної апоптозної програми. Одним із маркерів апоптозу є наявність рецепторів CD38 на поверхні імунокомпетентних клітин, які беруть участь у неспецифічній індукції апоптозу через систему циклічних нуклеотидів і кальцієвих каналів [1, 7].

Мета та завдання. Вивчити стан процесів апоптозу імунокомпетентних

клітин хворих вірусним гепатитом А та вплив амізону на прояви апоптозу.

Матеріали та методи. З метою оцінки вихідного стану імунної системи у 114 мешканців великого промислового регіону було проведено спеціальне імунологічне дослідження особам віком 18-40 років, що включало вивчення показників, які характеризували основні зміни клітинної та гуморальної ланок імунітету і стан фагоцитуючих клітин.

Стан процесів апоптозу у моноцитах, Т-хелперах/індукторах та цитотоксичних Т-супресорах вивчали морфологічним методом. Завись клітин наносили на предметне скельце, підсушували та фарбували акридином жовтогарячим наступним чином. Розчин акридину у дистильованій воді (0,1 % розчинювали перед використанням 10 % фосфатним буфером до рН=6,0-6,5 додаванням 0,1 М розчину NaH_2PO_4). Предметне скельце накривали розчином на 15 хв., далі видаляли його фільтрувальним папером та промивали свіжою порцією закисленого фосфатного буфера. Препарати досліджували з допомогою флуоресцентного мікроскопа з синім світлофільтром. ДНК у ядрах клітин, які не стали на шлях апоптозу, офарблювалось у зелений колір, а РНК у ядерцях та цитоплазмі – у червоний. При апоптозі червоне забарвлення проникало у цитоплазму, а фрагментоване ядро мало вигляд зелених кульок.

Кров для вивчення морфологічних особливостей моноцитів та лімфоцитів при апоптозі безпосередньо після забору та центрифугування опускали у фіксуючу суміш: 50 мл 0,2 М фосфатного

буфера (рН=7,0-7,4), 10 мл 25 % глутарового альдегіду, 12 мл 2,08 М сахарози, 28 мл дистильованої води. Фіксацію проводили протягом 1 год. при кімнатній температурі. Потім проби промивали в трьох змінах ізотонічного розчину сахарози по 15 хв. Дофіксували 1 % розчином чотирьохокису осмію на 1М фосфатному буфері, рН=7,2. Далі проби промивали в двох змінах дистильованої води по 15 хв. і зневоднювали в розчинах ацетону (50 %, 70 %, 96 %, 100 %, 100 %) по 10 хв. У якості заливальної смоли використовували таку суміш: 10 мл епону 812, 22 мл DDSA, 6 мл аралдиту М, 0,1 мл дібутилфталату, 1,0 мл DMP-30.

На пірамітомі LKB (Швеція) готували напівтонкі зрізи товщиною 0,25-0,5 мкм, фарбували толуїдиновим синім і переглядали у світловому мікроскопі для вибору відповідних ділянок. На ультратомі LKB-III (Швеція) готували ультратонкі зрізи, контрастували їх по 15 хв. розчинами ураніацетату і нітрату свинцю. Перегляд і фотографування здійснювалися на електронному мікроскопі JEM-100с (Японія) в Інституті біології медичного факультету Віденського університету (Австрія).

В ході дослідження, нашу увагу привернув препарат амізон (*Amizonum*, реєстраційний номер в Україні ЛП-000230,

володар реєстраційного посвідчення Товариство з обмеженою відповідальністю «Фармак», Україна) – похідне ізонікотинової кислоти. Препарат створений у Інституті фармакології Академії медичних наук України (м. Київ), пройшов повний цикл експериментальних та клінічних досліджень і, згідно до рішення Фармакологічного комітету Міністерства охорони здоров'я України (протокол № 8 від 31 жовтня 1996 р.), дозволений до використання [3, 4, 6].

З метою створення власних нормативних імунологічних показників нами було обстежено 98 дорослих практично здорових чоловіків і жінок віком від 25 до 35 років, що постійно мешкають у м. Луганську.

Результати та їх обговорення. Вивчення частоти розповсюдженості апоптичних маркерів показало, що у хворих на ВГА має місце підвищення експресії на імуноцитах периферичної крові рецепторів CD95 і CD38 (таблиця 1). Це є проявом збільшення частки імунокомпетентних клітин, які вступили на шлях апоптозу.

Як виявилось, приблизно однаково часто реєструвалися моноцити та Т-лімфоцити з апоптичними змінами, збільшення яких у порівнянні з подібними показниками практично здорових осіб коливалось від 1,9 до 2,5 разів.

Таблиця 1

Частота розповсюдженості маркерів апоптозу (рецепторів CD95 і CD38) на імунокомпетентних клітинах хворих на ВГА (%)

Імуноцити	Практично здорові особи (n=98)		Хворі на ВГА (n=114)	
	CD95+	CD38+	CD95+	CD38+
Моноцити	5,5±0,3	6,7±0,4	11,0±0,7*	16,8±1,0*
CD3+-лімфоцити	6,4±0,4	8,2±0,5	12,0±0,7*	16,4±0,9*
CD4+-лімфоцити	3,7±0,2	4,3±0,25	8,0±0,45*	9,8±0,6*
CD8+-лімфоцити	2,2±0,13	3,6±0,2	3,8±0,2*	6,4±0,4*
В-лімфоцити	4,5±0,3	6,4±0,35	7,6±0,45*	11,2±0,65*

Примітки: * - p<0,05; р розраховано відносно аналогічного показника практично здорових осіб

При аналізі субпопуляційного складу Т-лімфоцитів відзначено, що більш виражений перехід до апоптозу мав місце в Т-хелперів/індукторів, ніж у цитотоксичних Т-супресорів. Так, рівні CD95- і CD38-позитивних Т-хелперів/індукторів у 2,1 і 1,5 рази відповідно перевищували такі для цитотоксичних Т-супресорів. Подібна динамі-

ка змін кількості клітин, які апоптують, спостерігалася також і по відношенню до В-лімфоцитів.

Поряд із вивченням апоптозного фенотипу за кластерами диференціювання, нами проведене електронно-мікроскопічне дослідження імуноцитів хворих на ВГА.

Як виявилось, індукція експресії CD95- і CD38-рецепторів на імунокомпетентних клітинах супроводжувалась зростанням кількості імуноцитів з типовими для апоптозу морфологічними змінами. Апоптозні клітини характеризувалися зберіганням цілісності плазматичної мембрани і внутрішньоклітинних органел; клітини, як правило, округлялись, стискувались, втрачали мікрроворсинки. Ядерний хроматин апоптозних клітин піддавався агрегації та фрагмен-

тації. Частина клітин, які ступили на шлях апоптозу, являла собою апоптозні тіла – фрагменти апоптозних клітин, що містили шматки конденсованого ядра, або позбавлені ядерного матеріалу.

Зведені дані про апоптозний морфогенез імуноцитів хворих на ВГА подані у таблиці 2. Встановлено, що у хворих на ВГА збільшена кількість клітин, які мають типові прояви апоптозу.

Таблиця 2
Апоптозний морфогенез імунокомпетентних клітин хворих на вірусний гепатит А in vitro (%)

Показник	Моноцити	Лімфоцити
Хворі на ВГА (n=114)	11,2±0,7*	15,4±1,1*
Практично здорові особи (n=98)	2,5±0,18	3,0±0,2

Примітки: * - $p < 0,05$; р розраховано відносно до аналогічного показника практично здорових осіб

Вплив амізону на експресію маркерів апоптозу. Поряд із вивченням апоптозного фенотипу за кластерами диференціювання, нами проведено електронно-мікроскопічне дослідження імуноцитів хворих на ВГА. Виявилось, індукція експонування CD95- і CD38-рецепторів на мембранах імунокомпетентних клітин супроводжувалась зростанням кількості імуноцитів з типовими для апоптозу морфологічними змінами. Апоптозні клітини характеризувалися зберіганням цілісності плазматичної мембрани і внутрішньоклітинних орга-

нел; клітини, як правило, округлялись, стискувались, втрачали мікрроворсинки. Ядерний хроматин апоптозних клітин піддавався агрегації та фрагментації. Частина клітин, які ступили на шлях апоптозу, являла собою апоптозні тіла – фрагменти апоптозних клітин, що містили шматки конденсованого ядра, або позбавлені ядерного матеріалу.

Результати дослідження впливу обробки розчином амізону на експресію маркерів апоптозу на цитоплазматичних мембранах моноцитів подані у таблиці 3.

Таблиця 3
Вплив обробки розчином амізону на експресію маркерів апоптозу на цитоплазматичних мембранах моноцитів крові хворих на гепатит А in vitro, M±m

Показник, %	Культури клітин практично здорових осіб (n=50)	Інтактні культури клітин хворих на ВГА (n=39)	Культури клітин хворих на ВГА, оброблені розчином амізону (n=42)
CD38	3,7±0,19	8,0±0,4	6,5±0,33*
CD95	2,0±0,1	5,1±0,3	3,9±0,2*

Примітки: * - $p < 0,05$ відносно інтактних культур клітин хворих на ВГА

У хворих на ВГА експресія CD38-рецепторів на цитоплазматичних мембранах моноцитів, оброблених амізоном, виявилась зниженою проти показника інтактних клітин хворих у 1,23 разу ($p < 0,05$). Відносно CD95-рецепторів зниження за аналогічних умов порівняння склало 1,3 разу ($p < 0,05$). Разом з цим, незважаючи на позитивний вплив амізону на інтенсивності

експресії CD38- та CD95-рецепторів, кількість моноцитів з рецепторами CD38 в експерименті з амізоном перевищувала відповідний показник практично здорових осіб у 1,76 разу (в групі інтактних моноцитів хворих – в 2,16 разу); а кількість CD95+-моноцитів – у 1,95 разу (в групі порівняння – у 2,57 разу).

У хворих на ВГА експресія CD38-рецепторів на цитоплазматичних мембранах Т-хелперів/індукторів, оброблених амізеном, виявилась зниженою проти аналогічного показника інтактних клітин хворих в 1,18 разу ($p < 0,05$) (таблиця 4). Відносно CD95-рецепторів зниження за аналогічних умов порівняння склало 1,25 разу ($p < 0,05$). Але, незважаючи на позитивний вплив амізону на інтенсивність експресії рецепторів до маркерів апопто-

зу, кількість CD38+-клітин в досліді з амізеном перевищувала відповідний показник практично здорових осіб у 2,46 разу (в групі інтактних Т-хелперів/індукторів хворих – у 2,91 разу). Перевищення експресії CD95-рецепторів на цитоплазматичних мембранах клітин, оброблених амізеном, склало 1,86 разу, а в групі порівняння – 2,32 разу.

Таблиця 4

Вплив обробки розчином амізону на експресію маркерів апоптозу на цитоплазматичних мембранах Т-хелперів/індукторів крові хворих на гепатит А in vitro, $M \pm m$

Показник, %	Культури клітин практично здорових осіб (n=50)	Інтактні культури клітин хворих на ВГА (n=36)	Культури клітин хворих на ВГА, оброблені розчином амізону (n=41)
CD38	2,8±0,13	8,15±0,41	6,9±0,35*
CD95	1,3±0,07	3,02±0,15	2,42±0,12*

Примітки: * - $p < 0,05$ відносно інтактних культур клітин хворих на ВГА

У хворих на ВГА експресія CD38-рецепторів на цитоплазматичних мембранах цитотоксичних Т-супресорів, оброблених амізеном, виявилась зниженою у 1,25 разу ($p < 0,05$) проти аналогічного показника інтактних клітин хворих на ВГА (таблиця 5).

Відносно CD95-рецепторів зниження за аналогічних умов порівняння склало 1,19 разу ($p < 0,05$). Але, незважаючи на позитивний вплив амізону на інтенсив-

ність експресії рецепторів до маркерів апоптозу, кількість CD38+-клітин в досліді з амізеном перевищувала відповідний показник практично здорових осіб у 1,3 разу (в інтактних клітин хворих – у 1,63 разу). Для експресії CD95-рецепторів на цитоплазматичних мембранах клітин, оброблених амізеном перевищення склало 1,21 разу (в групі порівняння – 1,48 разу).

Таблиця 5

Вплив обробки розчином амізону на експресію маркерів апоптозу на цитоплазматичних мембранах цитотоксичних Т-супресорів крові хворих на гепатит А in vitro, $M \pm m$

Показник, %	Культури клітин практично здорових осіб (n=50)	Інтактні культури клітин хворих на ВГА (n=39)	Культури клітин хворих на ВГА, оброблені розчином амізону (n=42)
CD38	2,5±0,12	4,08±0,2	3,26±0,16*
CD95	1,6±0,08	2,37±0,12	1,94±0,1*

Примітки: * - $p < 0,05$ відносно інтактних культур клітин хворих на ВГА

Висновки. Таким чином, вважаємо за потрібне відзначити, що у хворих на ВГА збільшена кількість клітин, які ступили на шлях апоптозу. На мембранах цих клітин посилюється експонування CD95- та CD38-рецепторів, які є відповідно маркерами запуску специфічної і неспецифічної апоптозної програми. Крім того, у хворих на ВГА зростає частка імуніцитів, які мають типові морфологічні прояви апоптозу. Зро-

зуміло, що запуск апоптозної програми супроводжується зниженням функціональної активності імунікомпетентних клітин, насамперед реактивності до рецепторзалежних стимулів. Це пов'язано з ослабленням експресії мембранних рецепторів і порушенням пострецепторних каналів, які передають сигнали. Під впливом амізону на цитоплазматичних мембранах моноцитів та Т-лімфоцитів

пригнічувалось експонування CD38- та CD95-рецепторів апоптозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фролов В.М. Использование «иммунологического компаса» для диагностики иммунных нарушений / В.М. Фролов, Н.А. Пересадин, С.Е. Казакова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 1. – С. 10-13.
2. Попова О.Е. Гепатит А (общие вопросы этиологии, диагностики и вакцинопрофилактики) / О.Е. Попова, Н.А. Замятина // Мир вирусных гепатитов. – 2001. – № 8. – С. 5-8.
3. Фролов В.М. Глутаргин в лечении больных вирусным гепатитом А при эпидемической заболеваемости / В.М. Фролов, А.Н. Тищенко, Н.И. Хомутиянская // Ліки України. – 2003. – № 9 (74). – С. 46-48.
4. Луговсков А.Д. Анализ эффективности профилактиче-

ского применения амизона при вспышечной заболеваемости вирусными гепатитами А и Е в индустриальном регионе / А.Д. Луговсков // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. праць – Київ; Луганськ; Харків, 2004. – Вип. 6 (59). – С. 438-447

5. Михайлов М.И. Гепатит А: проблемы диагностики, эпидемиологии и вакцинопрофилактики / М.И. Михайлов, И.В. Шахгильдян // Лечащий врач. – 2005. – № 1. – С. 14-18.
6. Чистенко Г.А. Эпидемиология. Противозидемические мероприятия в очагах инфекционных болезней / Г.А. Чистенко, А.Н. Близнюк. – М.: Новое знание, 2007. – 368 с.
7. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення / І.М. Трахтенберг, Н.М. Дмитруха, О.С. Моложава, Ю.М. Миронюк // Інфекційні хвороби. – 2008. – № 4. – С. 82-89.

Луговсков А.Д., Козикова О.А., Жила А.В., Руденко А.А., Головчанская С.Е. ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА ИМУННОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ А

Резюме. В работе представлены результаты изучения клеток, которые находятся в состоянии апоптоза и экспонирования на мембранах этих клеток CD95- и CD38-рецепторов. Установлено, что у больных ВГА, увеличивается часть иммуноцитов, которые имеют типичные морфологические проявления апоптоза. Под влиянием амизона на цитоплазматических мембранах моноцитов и Т-лимфоцитах уменьшается экспонирование CD38- та CD95-рецепторов апоптоза.

Ключевые слова: вирусный гепатит А, апоптоз, амизон

Lugovskov A.D., Kozikova O.A. Zhila A.V. Rudenko A.A. Golovchanskaya S.E. STUDYING OF A CONDITION OF PROCESSES APOPTOSIS IMMUNOKOMPETENTNY CELLS IN THE PATIENTS WITH VIRAL HEPATITIS A
Summary. In work results of studying of cages which are in a condition apoptosis and exhibiting on membranes of these cages of CD95- and CD38 receptors are presented. It is established that in the patients with VGA, the part of immunocytes which have typical morphological manifestations apoptosis increases. Under influence amizon on sitoplazmatic membranes of monocytes and T-lymphocytes CD38-exhibiting and CD95 receptors apoptosis decreases.

Keywords: viral hepatitis A, apoptosis, amizone

Рецензет: проф. Иванова Л.М.

УДК 616.233-002.193-053.5:616.361

КЛІНІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ РЕЦИДИВУЮЧОГО БРОНХІТУ У ДІТЕЙ ІЗ СУПУТНЬОЮ БІЛІАРНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Бабінова О.В.

Кафедра пропедевтики педіатрії з доглядом за хворими, ДЗ «Луганський державний медичний університет», м. Луганськ, Україна

Резюме. Обстежено 42 дитини із рецидивуючим бронхітом і 85 пацієнтів із рецидивуючим бронхітом на фоні супутньої патології біліарної системи віком від 6 до 14 років. Для дітей із рецидивуючим бронхітом і супутньою патологією біліарної системи було характерним більш часті рецидиви бронхіту, довша тривалість кожного епізоду основного захворювання і тенденція до більш тривалого перебігу.

Ключевые слова: рецидивуючий бронхіт, біліарна патологія, діти

Вступ. Нині в багатьох індустріальних країнах світу, в тому числі в Україні, відмічається збільшення кількості дітей з бронхолегеневою патологією, особливо хворих на рецидивуючий і хронічний бронхіт [1, 2, 5]. Патологічні процеси бронхолегеневого апарату в дитячому віці мають тенденцію до тривалого та ускладненого перебігу, а також трансформації в більш складні форми з послідовною інвалідизацією [4, 6]. Тому рецидивуючий бронхіт (РБ) несе у собі потужну загрозу здоров'ю населення майбутнього і, відповідно, суттєву втрату працездатного потенціалу країни [1, 2, 5].

За даними різних авторів, майже 50% хворих на хронічну та рецидивуючу бронхолегеневу патологією мають поєднане ураження гепатобіліарної системи [3, 5]. У дітей із функціональними розладами біліарного тракту (ФРБТ) змінюються літогенні властивості жовчі, розвиваються дисбіотичні порушення кишечника та дисфункція імунної системи. Ці процеси призводять до поглиблення змін в імунному статусі дітей із РБ та ускладнюють здійснення лікувально-реабілітаційних заходів [1, 2, 4, 6].

Вплив стану біліарної системи на патогенез рецидивуючого перебігу бронхі-