

І. Ф. Ільїнська, О. М. Рекалова, Л. В. Ареф'єва, О. В. Гриценко, О. М. Зубрійчук
АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛОЦИТІВ ТА ЙОГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ
В ЛЕГЕНЯХ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ТА НЕСПЕЦИФІЧНОГО ГЕНЕЗУ

ДУ "Інститут фізіотерії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України"

Пильна увага дослідників до механізмів реалізації програмованої смерті (ПС) клітин імунного захисту обумовлена їх значенням в імунопатогенезі різних захворювань, у тому числі легеневих. Апоптична смерть клітин, яка спрямована на підтримку антигенструктурного гомеостазу організму, з одного боку, вважається одним із найважливіших інструментів його протиінфекційного захисту, а з іншого, може виступати основною ланкою патологічного процесу і певною мірою визначати його характер. Саме апоптозу та порушенням його регуляції належить одне з провідних місць у виникненні запалення, розвитку імунної недостатності, персистенції мікроорганізмів та звільненні організму хазяїна від екзогенних та ендогенних патогенів [1, 3, 5, 8, 12, 16].

Звертає на себе увагу подібність апоптозу клітин макроорганізму (еукаріот) з процесами, які відбуваються в мікроорганізмах (прокаріот) при їх переході у нетипові форми: спорові, ті, що фільтруються, L-форми. Відомо, що такі форми патогенів зберігають життєздатність, мають вкрай низьку метаболічну активність, не розмножуються й проявляють опірність до дії більшості ушкоджуючих агентів. Однак вони можуть бути виведені зі стану спокою різними способами, специфічними для конкретних видів і штамів бактерій, наприклад, шляхом їх пасажу через чутливу тварину чи за допомогою певних сигнальних речовин, які синтезуються активно зростаючими клітинами. При цьому атипові макроорганізми знову набувають втрачені біологічні властивості: здатність до розмноження, вірулентність та патогенність [7, 8, 11]. В морфології й біохімії таких "відпочиваючих" клітин спостерігаються ті ж самі зміни, що й при апоптозі: зменшення розмірів, активація протеолітичних ферментів, деградація РНК і рибосом. Ці процеси гіпотетично розглядаються як проапоптоз, тобто еволюційний попередник апоптозу [8].

Такими нетиповими формами збудника при туберкульозній інфекції є L-форми мікобактерій туберкульозу (МБТ). Як показали дослідження, проведені в недавньому минулому вітчизняними мікробіологами, вони виявляються в 32,1 % хворих на вперше виявлений деструктивний туберкульоз (ТБ) легень після припинення ними виділення типових МБТ, і з них 72,8 % мають схильність до реверсії *in vitro*. Було продемонстровано, що наприкінці курсу антибактеріальної терапії в осіб із залишковими явищами після перенесеного ТБ L-форми виділялися у 14,2 % пацієнтів (із них схильність до реверсії відзначена в 42,8 % штамів). Причому в осіб з великими залишковими посттуберкульозними змінами L-форми виявлялися в 5,4 рази частіше, ніж в осіб із малими посттуберкульозними змінами. А при рецидивах туберкульозного процесу виділення L-форм МБТ зустрічалося вже в 40, 6 % випадків, з них 72,7 % реверсували *in vitro* у бактеріальні форми збудника, які мали усі властивості типових МБТ, зокрема, вірулентність для мурчаків [7].

Здатність утворювати L-форми характерна і для кокової мікрофлори, зокрема, стафілококів, які виступають головним етіологічним чинником неспецифічних захворювань легень. Такі трансформації також мають місце переважно при застосуванні антибактеріальної терапії. Відомо, що при перетворенні стафілококів у L-форми гальмуються функції розмноження, але повністю здатність до росту не втрачається. L-формам стафілококів притаманна знижена вірулентність, через що вони можуть тривалий час не викликати гострого запалення. Вважається, що формування стафілококового носійства, хронічних форм піодермії, поява стійкості до лікарських препаратів обумовлені саме трансформацією стафілококів у їх L-форми [11].

До ефекторних клітин, головна функція яких спрямована саме на елімінацію інфекційних агентів, що потрапили до організму, належать нейтрофілоцити (НФ). Ці функції реалізуються ними через процеси поглинання інфекційного агента та його перетравлення — внутрішньоклітинної деструкції завдяки секреції НФ факторів, які викликають пошкодження (апоптоз) генетичного апарату збудника і, таким чином, запобігають його розповсюдженню. Щоб ці індуктори апоптозу почали діяти на геном мікроорганізму, вони мають проникнути крізь його мембрану. Це досягається порушенням цілісності останніх завдяки дії гідролітичних ферментів, нейтральних протеїназ та лізоциму, які також містяться в гранулах нейтрофільних гранулоцитів (НФ) [2].

Відомо, що генетична програма ПС у зрілих НФ включена, і саме тому вони мають сегментоване ядро та експресують на своїй поверхні характерні апоптичні структури — детермінанти, які швидко розпізнаються фагоцитуючими макрофагами (МФ) [2, 5]. Це забезпечує ефективну елімінацію апоптичних НФ, в тому числі інфікованих мікроорганізмами, та процесінг і презентацію МФ окремих бактеріальних антигенів, тобто ініціацію специфічних імунних реакцій — синтез специфічних антитіл та утворення клонів ефекторних Т-лімфоцитів.

Інша ситуація виникає в разі надходження надмірної кількості збудника, коли функціонального резерву НФ не вистачає для його повноцінного поглинання та перетравлення. Щоб стримати розповсюдження інфекції, активовані НФ викидають ферментні сполуки та індуктори апоптозу, що містяться в їх гранулах, безпосередньо у міжклітинний простір. Внаслідок цього відбувається руйнація як чужорідних мікроорганізмів, так і клітин мікрооточення. Масова їх загибель включає захисні механізми, спрямовані на обмеження цієї зони ураження, тобто ініціює розвиток запальної реакції [2, 19].

НФ вважаються критичними для ініціації імунної відповіді й здатні знешкоджувати переважну більшість екстрацелюлярних бактеріальних патогенів. Проте деякі з них, наприклад, *Staphylococcus aureus*, набули здатність уникати руйнівної дії НФ. Так, в деяких модельних експериментах на мишах було продемонстровано, що штамам *Staphylococcus aureus*, виділеним в осередках нозоко-

міальної стафілококової інфекції, притаманні більш висока вірулентність та патогенність, ніж штамам, виділеним від хворих із негоспітальними інфекціями. Хоча фагоцитоз кожного з цих штамів призводив до запуску продукції НФ реактивного кисню та злиття фагосоми з лізосомальними гранулами, ті стафілококи, що були виділені від хворих із внутрішньолікарняними стафілококовими інфекціями були менш чутливими до дії ферментів НФ та самі спричиняли більш суттєвий лізис клітин хазяїна. Виявилося, що експресія генів, які кодують синтез капсулярних субстанцій, регуляторних генів та оксидативного стресу зменшувалася в НФ при поглинанні ними *Staphylococcus aureus*, особливо при фагоцитозі штамів, отриманих із нозокоміальних осередків інфекції. Результати цих досліджень свідчать про зміни програми транскрипції генів, які відбуваються при надходженні патогену в НФ і забезпечують уникнення цих збудників від уроджених механізмів неспецифічного захисту [20, 21, 24].

Внутрішньоклітинні (інтрацелюлярні) патогени, які спричиняють розвиток повільних інфекцій, і в тому числі МБТ, не лише ухиляються від факторів імунологічної реактивності макроорганізму, але й експлуатують їх для власної експансії. Широко відомо, що НФ фагоцитують МБТ, які проникли у внутрішнє середовище організму людини, але не здатні їх знешкодити через виділення мікобактеріями факторів, які перешкоджають злиттю фагосоми з лізосомами [3, 4]. Отже, МБТ залишаються в НФ упакованими в одношарову мембрану фагосоми [3].

Після інфікування МБТ у нейтрофілоцитах відбувається суттєве збільшення вмісту та прискорення активації каспази-3, швидке та короткочасне збільшення експресії Вах протеїну (проапоптичного члена з родини Bcl-2 протеїнів — головних внутрішньоклітинних регуляторів апоптозу), та виразне зменшення експресії антиапоптичного протеїну Bcl-x (L), що спричиняє швидку клітинну смерть цих клітин. Остання має усі ознаки апоптозу: характерні морфологічні перетворення, вивільнення фосфатидилсерину (який відноситься до перфоринів) та фрагментацію ДНК [23]. Експерименти Aleman M. та спів-авт. [22], підтверджують наведені вище дані. Цими авторами було продемонстровано, що свіжовиділені НФ пацієнтів із запальними захворюваннями легень неспеци-

фічного генезу мають підвищену експресію активаційного маркера CD11b та зростання експресії Fas, що призводить до посилення апоптозу цих активованих НФ, а МБТ і туберкулін (PPD) спільно з фактором некрозу пухлини-альфа (TNF- α) додатково прискорюють (індукують) програмовану смерть нейтрофілоцитів [17].

Вважається, що зміна форми та розмірів апоптичних клітин відбувається завдяки активації трансглютамінази, яка спричиняє в цитоплазматичних протеїнах утворення перехресних зв'язків, що призводить до формування своєрідного прошарку під зовнішньою оболонкою, подібного ороговілим епітеліальним клітинам [8, 12]. Апоптозна трансформація клітинної оболонки НФ, яка характеризується її ущільненням, багато чисельними інвагінаціями, втратою мікроворсинок та утворенням пухирців, супроводжується експресією на поверхні цих клітин специфічних детермінантних груп, завдяки чому вони досить швидко поглинаються МФ.

Отже, ті МБТ, які у такий спосіб інфікують МФ, використовують НФ, як "троянського коня" [3, 4], де вони перебувають вже під захистом міцної двошарової мембрани. Всередині макрофагів вони також містяться у фагосомах і завдяки цьому набувають ще один додатковий мембранний шар, а при апоптозі інфікованого МФ — уже два. Цей апоптичний МФ може поглинатися іншим МФ, і процес повторюється знову та знову. Така багатошарова міцна оболонка з власних мембранних структур робить МБТ практично недосяжними для внутрішньоклітинних бактерицидних ферментних сполук МФ і дії кілерних клітин та призводить до тривалої персистенції. Персистенція МБТ забезпечує тривале носійство, що з одного боку, підтримує певний рівень протитуберкульозного імунітету (в т.ч. поствакцинального), а з іншого виступає джерелом ендогенної мікобактеріальної інфекції, яка за несприятливих змін імунологічної реактивності макроорганізму активується й викликає маніфестацію захворювання.

Таким чином, апоптоз НФ, індукований екстрацелюлярними та інтрацелюлярними бактеріальними патогенами, має різне патогенетичне значення: якщо при інфекціях, викликаних коковою мікрофлорою, він має захисний характер, спрямований на елімінацію збудника і відновлення клітинного гомеостазу макроорганізму, то при інфекціях, спричинених внутрішньоклітинними агентами, зокрема МБТ, індуція ПС інфікованих ними НФ може використовуватися збудником для власної експансії та захисту від імунних механізмів макроорганізму й сприяти подальшому розвитку патологічного процесу. З огляду на це, оцінка показників, які характеризують апоптоз НФ у хворих на ТБ і неспецифічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ), має проводитися в комплексі з іншими показниками, такими як наявність нейтрофілозу або нейтропенії, а також зі здатністю фагоцитуючих клітин до поглинання, яка з одного боку обумовлює певний рівень інфікування клітин бактеріальними патогенами, а з іншого визначає інтенсивність їх елімінації МФ з вогнища запалення та ефективність видалення апоптичних клітин (рис. 1).

Спроба проведення такої оцінки у хворих з туберкульозним та неспецифічним запаленням легень і стала метою проведення даного дослідження.

Методи дослідження

Для характеристики процесів програмованої смерті (ПС) НФ в периферичній крові (ПК) у здорових осіб і па-



Рис. 1. Патогенетичне значення апоптозу нейтрофільних гранулоцитів при туберкульозі та неспецифічних запальних захворюваннях легень

цієнтів із запаленням туберкульозного (ТБ) та неспецифічного генезу (ХОЗЛ) визначали вміст лейкоцитів та загальної популяції НФ, кількість НФ з апоптичною морфологією, інтенсивність спонтанного апоптозу НФ, апоптичні властивості аутосероватки та інтенсивність апоптозу НФ, індукованого МБТ.

Вміст лейкоцитів та НФ в крові визначали стандартним способом — підрахунком кількості клітин білої крові в камері Горяєва та лейкограми в мазках, фарбованих за Романовським-Гімза.

Вміст НФ з апоптичною морфологією виступає інтегральним показником, який відображує стан спонтанного, активаційного та індукованого апоптозу НФ, тому що посилення та/або гальмування вищезазначених процесів *in vivo* реалізується паралельно (одночасно). Для його визначення поетапно здійснювали виділення чистої популяції гранулоцитів крові на подвійному градієнті щільності, доведення концентрації отриманої клітинної суспензії до $2,0\text{--}5,0 \cdot 10^6/\text{мл}$ та приготування з неї цитоцентрифужних препаратів, в яких клітина розтягується на предметному скельці, внаслідок чого ядерні фрагменти апоптозних клітин розходяться і добре диференціюються. Це дозволяє проводити звичайну світлову мікроскопію препаратів після їх фіксації метанолом і стандартного фарбування за Романовського-Гімза, діамантовим зеленим, фуксином або сафраніном (рис. 2).

Визначення інтенсивності програмованої смерті — спонтанного апоптозу НФ також передбачає підрахування відсотку клітин з біохімічними або морфологічними ознаками апоптозу (рис. 2), але воно проводиться після інкубації чистої популяції цих клітин в повному поживному середовищі 199 або RPMI (що містять антибіотики, НЕРЕС та ембріональну телячу сироватку) протягом певного часу [1, 9]. Але присутність клітин з апоптичною морфологією у вихідній популяції НФ, їх спонтанна адгезія до скла/пластику та втрата цієї здатності під час розвитку ПС спотворює отримані результати. Щоб уникнути цього, дослідники або використовують в роботі лише силіконований посуд (який перешкоджає адгезії), або проводять додаткову обробку клітин етилдiamiнтетраоцетатом (ЕДТА) для відокремлення усіх клітин від скла/пластмаси, або враховують адгезивність і вміст апоптичних НФ у свіжовиділеній клітинній суспензії перед інкубацією та після її завершення [1, 9]. Ці маніпуляції подовжують та ускладнюють проведення дослідження. Щоб мінімізувати втрати адгерентних фагоцитів і тих клітин, які внаслідок розвитку апоптозу втрачають свої адге-

зивні властивості та відклеюються від скла [1], ми здійснювали оцінку інтенсивності програмованої смерті адгерентних НФ (що не містять апоптичних клітин) в їх моношарі в лунках предметних скелець з обмежувальними кільцями, які дозволяють проводити центрифугування проб та отримувати цитоцентрифужні препарати негайно після завершення інкубації клітин (рис. 3).

Для оцінки апоптичних властивостей аутосероватки інкубацію НФ проводили в повному поживному середовищі з 20 % вмістом свіжої аутосероватки. Відомо, що позаклітинна регуляція процесів програмованої смерті клітин здійснюється чисельними про- та антиапоптичними сигналами (факторами), які сприймаються відповідними мембранними рецепторами клітин. Отже, доля кожної з них визначається співвідношенням цих факторів у сироватці ПК та щільністю експресії відповідних рецепторних структур та відображується зростанням або гальмуванням інтенсивності апоптозу — відповідно індексами індукції або інгібіції, які обчислюються за формулами:

$$I_i = (Pa_{ac} - Pa_{cn}) / Pa_{cn}, \text{ де}$$

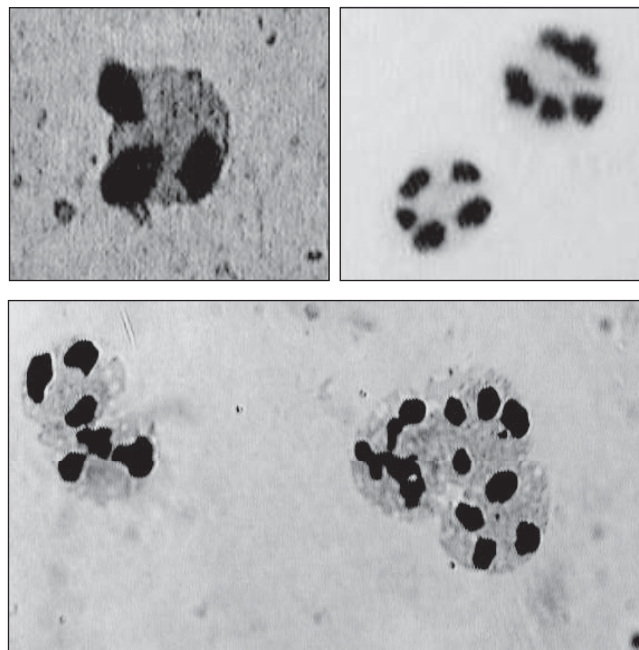


Рис. 2. Нейтрофіли з апоптичною морфологією в цитоцентрифужних препаратах



Рис. 3. Постановка реакцій з визначення інтенсивності апоптозу клітин імунного захисту проводиться в лунках предметних скелець з обмежувальними кільцями

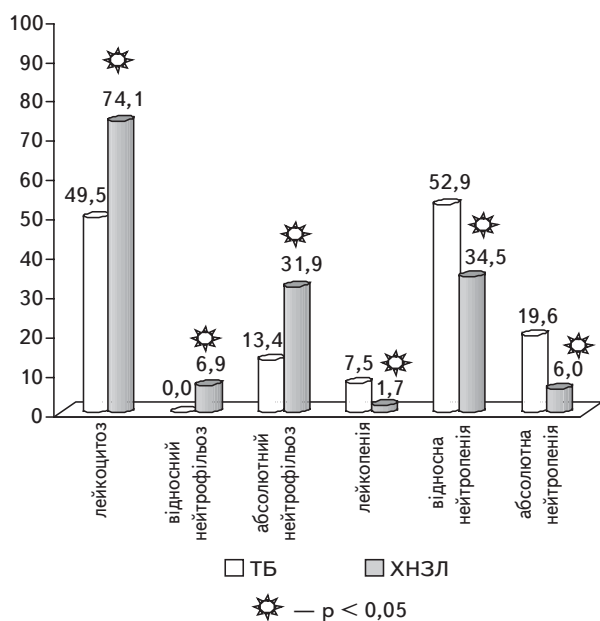


Рис. 4. Частота лейкоцитозу та лейкопенії, нейтрофіліозу та нейтропенії у хворих на туберкульоз та хронічні неспецифічні захворювання легень

I_i — індекс індукції/інгібіції,

Π_{ac} — показник апоптозу в присутності аутосеруватки

Π_{sp} — показник спонтанного апоптозу

Численними дослідженнями доведено, що різноманітні бактерії (МБТ, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* та інші) здатні регулювати інтенсивність програмованої смерті інфікованих ними фагоцитів [22]. Але інфікованість фагоцитів бактеріями, яка відбувається за рахунок їх активного поглинання, неодноразова [6]. Тому той же самий показник апоптозу фагоцитуючих клітин при високій інфікованості останніх може бути недостатнім, а при низькій — надмірним. Тому, для коректного визначення показника індукованого бактеріями апоптозу фагоцитів необхідно враховувати їх бактеріальне навантаження. Отже, при здійсненні оцінки апоптозу НФ, індукованого бактеріальними патогенами *in vitro*, яку проводили шля-

хом їх інкубації в поживному середовищі з культурою МБТ в лунках предметних скелець з обмежувальними кільцями, отриманням цитоцентрифужних препаратів і подальшою їх мікроскопією з підрахуванням відносного вмісту апоптичних клітин, обов'язково паралельно визначали показник бактеріального навантаження НФ (Π_{BH} — процент клітин, що містять бактерії внутрішньоклітинно) та розраховували показник індукованого бактеріями апоптозу (Π_{BA}) за формулою:

$$\Pi_{BA} = 100 \cdot V_A / \Pi_{BH} (\%), \text{ де}$$

Π_A — процент апоптичних фагоцитів

Π_{BH} — показник бактеріального навантаження

Відомості про кількість осіб, які були обстежені з використанням кожного з перелічених вище методів, наведені у табл. 1–4.

Результати та їх обговорення

Процентний та абсолютний вміст НФ, в т.ч. з апоптичною морфологією у хворих на туберкульоз та загострення хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), а також загальні показники вмісту лейкоцитів та НФ, наведені в табл. 1. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що збільшення вмісту нейтрофілів у крові хворих на туберкульоз відбувалося переважно за рахунок лейкоцитозу і супроводжувалося вірогідним підвищенням кількості клітин з апоптичною морфологією, тоді як у пацієнтів із хронічним неспецифічним запаленням бронхо-легеневої системи спостерігалось зростання як відносної, так і абсолютної кількості НФ, а вміст апоптичних клітин не перевищував контрольного рівня.

Проведення індивідуалізованого аналізу вмісту лейкоцитів та НФ у крові обстежених продемонструвало наявність лейкоцитозу у кожного другого хворого на ТБ та у 2/3 пацієнтів із ХОЗЛ (рис. 4). При загостренні хронічного запалення в бронхо-легеневій системі неспецифічного генезу нейтрофіліоз мав місце в кожному третьому випадку, що 2,5 рази вище, ніж при ТБ. І, навпаки, нейтропенія виявилася втричі частішою саме у пацієнтів з туберкульозним процесом у легенях (рис. 4).

Характерно, що у хворих на ТБ з нейтропенією вміст НФ з апоптичною морфологією виявився в 5 разів нижчим, ніж у пацієнтів із нейтрофіліозом. В той же час вірогідної різниці цих показників у хворих на ХОЗЛ з нейтрофіліозом та нейтропенією знайдено не було

Таблиця 1

Вміст нейтрофільних гранулоцитів, в т.ч. з апоптичною морфологією в крові хворих на туберкульоз та неспецифічні запальні захворювання легень

Показники	Групи обстежених					
	Здорові особи		Хворі на туберкульоз легень		Хворі на неспецифічні запальні захворювання легень	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Вміст лейкоцитів ($10^9/\text{л}$)	61	6,69±0,13	99	8,16±0,31*	139	9,64±0,48**
Вміст нейтрофільних гранулоцитів (%)		48,3±1,3		46,0±1,5		54,3±1,2**
Вміст нейтрофільних гранулоцитів ($10^9/\text{л}$)		3,23±0,11		3,90±0,23*		5,18±0,25**
Вміст апоптичних нейтрофільних гранулоцитів (%)	21	20,0±1,7	97	24,4±1,2*	38	20,3±1,5*
Вміст апоптичних нейтрофільних гранулоцитів ($10^9/\text{л}$)		0,70±0,09		0,99±0,08*		0,82±0,08

Примітки: * — різниця показника в порівнянні з показником групи здорових осіб вірогідна ($p < 0,05$). ** — різниця показника в порівнянні з показником групи хворих на туберкульоз легень вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Вміст нейтрофільних гранулоцитів з апоптичною морфологією та частота його змін у хворих на туберкульоз та неспецифічні захворювання легень з нейтропенією та нейтрофіліозом ($M \pm m$)

Показники	Здорові особи (n=21)	Групи обстежених			
		Хворі на туберкульоз легень з:		Хворі на ХНЗЛ з:	
		нейтропенією (n=17)	нейтрофіліозом (n=13)	нейтропенією (n=16)	нейтрофіліозом (n=8)
Вміст апоптичних НГ ($10^9 / л$)	$0,70 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,06^*$	$2,22 \pm 0,36^{**}$	$0,89 \pm 0,13$	$1,24 \pm 0,21$
Частота зростання вмісту апоптичних НГ		—	$28,9 \pm 2,6^*$	$25,0 \pm 10,8^*$	$37,5 \pm 17,1$
Частота зменшення вмісту апоптичних НГ		$47,1 \pm 12,1$	—	$6,25 \pm 6,1^*$	$12,5 \pm 6,1$

Примітки: * — різниця показника в порівнянні з показником групи здорових осіб вірогідна ($p < 0,05$). * — різниця між показниками хворих на туберкульоз легень та ХНЗЛ вірогідна ($p < 0,05$). * — різниця між показниками хворих з нейтропенією та нейтрофіліозом вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 3

Інтенсивність спонтанного апоптозу НГ та апоптогенні властивості аутоосироватки у хворих на туберкульоз та неспецифічні запальні захворювання легень ($M \pm m$)

Показники	Групи обстежених					
	Здорові особи		Хворі на туберкульоз легень		Хворі на неспецифічні запальні захворювання легень	
	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$
Інтенсивність спонтанного апоптозу НГ (%)	38	$18,8 \pm 0,6$	71	$38,0 \pm 2,1^*$	79	$28,5 \pm 1,3^{**}$
Інтенсивність апоптозу НГ в присутності аутоосироватки (%)	24	$24,0 \pm 1,7$	35	$37,6 \pm 3,2^*$	34	$26,4 \pm 2,0^*$
Частота виявлення проапоптичного впливу аутоосироватки на НГ (%)	21	$87,5 \pm 5,7$	22	$64,7 \pm 8,2^*$	14	$41,2 \pm 9,5^*$
Індекс індукції (у.о.)		$0,49 \pm 0,09$		$0,46 \pm 0,07$		$0,43 \pm 0,17$
Частота виявлення антиапоптичного впливу аутоосироватки (%)	3	$12,5 \pm 5,7$	12	$35,3 \pm 8,2^*$	13	$38,2 \pm 9,4^*$
Індекс інгібіції (у.о.)		$0,42 \pm 0,16$		$0,44 \pm 0,06$		$0,31 \pm 0,06$

Примітки: * — різниця показника в порівнянні з показником групи здорових осіб вірогідна ($p < 0,05$). * — різниця показника в порівнянні з показником групи хворих на туберкульоз легень вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Процент апоптичних клітин, показники інтенсивності поглинання МБТ та індукованого ними апоптозу нейтрофільних фагоцитів у донорів крові та хворих на туберкульоз та неспецифічні захворювання легень ($M \pm m$)

Показники	Групи обстежених		
	Здорові особи (n=21)	Хворі на туберкульоз легень (n=24)	Хворі на неспецифічні запальні захворювання легень (n=45)
Інтенсивність поглинання МБТ (%)	$30,6 \pm 3,1$	$18,5 \pm 1,7^*$	$27,0 \pm 2,8^*$
Вміст апоптичних клітин після інкубації (%)	$30,1 \pm 0,1$	$43,5 \pm 5,3^*$	$36,0 \pm 3,1^*$
Показник апоптозу, індукованого МБТ (%)	$118,0 \pm 12,3$	$247,3 \pm 29,5^*$	$166,8 \pm 21,3^{**}$

Примітки: * — різниця показника в порівнянні з показником групи здорових осіб вірогідна ($p < 0,05$). ♦ — різниця показника в порівнянні з показником групи хворих на туберкульоз легень вірогідна ($p < 0,05$).

(табл. 2). Ці відмінності також проявлялися у частоті підвищення та зменшення присутності апоптичних НГ у пацієнтів обстежених груп з нейтрофіліозом та нейтропенією (там же). Так, зростання абсолютного вмісту апоптичних НГ спостерігалось в кожному четвертому випадку нейтропенії при ХОЗЛ і в жодному — при ТБ, проте зменшення цього показника було продемонстровано майже у половини пацієнтів з ТБ і лише у 6,3 % хворих із неспецифічним запальним процесом у легенях. Навпаки, зростання вмісту апоптичних НГ в крові при нейтрофіліозі у хворих з цією патологією мало місце у 12,5 % випад-

ках, і в жодному — у пацієнтів з туберкульозним процесом у легенях (табл. 2).

Вірогідне зростання інтенсивності програмованої смерті НГ (спонтанного апоптозу) було зареєстроване в обох групах пацієнтів, проте при ТБ воно було більш виразним і вірогідно відрізнялося як від контрольних показників, так і від показників групи хворих на ХОЗЛ (табл. 3). Це підтверджувалося і результатами вивчення апоптогенних властивостей аутоосироватки. Інтенсивність апоптозу в присутності аутоосироватки у хворих на ТБ зростала майже у півтора рази, а частота виявлення про-

апоптичного її впливу мала місце у 2/3 обстежених пацієнтів цієї групи. В той же час показники інтенсивності ПС НФ у присутності аутосіроватки у хворих на ХОЗЛ не відрізнялися від контрольних, а частота виявлення її проти антиапоптичної дії була майже однаковою.

Зростання інтенсивності ПС НФ, індукованої МБТ, зафіксовано в обох групах пацієнтів із запальними захворюваннями легень (табл. 4). Але більш виразну індукцію МБТ апоптозу НФ виявлено також у групі пацієнтів із туберкульозним процесом у легенях, яке відбувалося попри зменшення інтенсивності поглинання МБТ цією популяцією фагоцитів НФ (табл. 4).

Отже, отримані дані свідчать про те, що саме цей механізм може обумовлювати виникнення нейтропенії у пацієнтів з туберкульозним процесом в легенях.

Таким чином, аналіз результатів проведеного дослідження демонструє різне значення апоптозу в патогенезі запальних захворювань легень туберкульозного й неспецифічного генезу та дає можливість зробити висновок про більшу патологічну спрямованість змін процесів програмованої смерті НФ при ТБ, ніж при загостренні неспецифічного запалення. Як було продемонстровано вище, майже у половини хворих на ХОЗЛ зрушення показників, які характеризують процеси програмованої смерті НФ, мають закономірний характер і спрямовані на відновлення клітинно-структурного гомеостазу, тоді як у пацієнтів з ТБ легень у більшості випадків ці зміни призводять до подальшого розвитку патологічного стану та його хронізації. Це має враховуватися як при проведенні комплексної оцінки стану імунологічної резистентності пацієнтів з даними захворюваннями, так і при визначенні терапевтичної тактики в кожному окремому випадку, особливо при використанні імуномодуляторів.

Висновки

1. Апоптоз НФ, індукований екстрацелюлярними та інтрацелюлярними бактеріальними патогенами, має різне патогенетичне значення: якщо при інфекціях, викликаних коковою мікрофлорою він має захисний характер, спрямований на елімінацію збудника і відновлення клітинного гомеостазу макроорганізму, то при інфекціях, спричинених внутрішньоклітинними агентами, зокрема МБТ, індукція програмованої смерті інфікованих ними НФ використовується збудником для власної експансії та захисту від імунних механізмів макроорганізму й сприяє подальшому розвитку патологічного процесу.

2. При загостренні хронічного запалення в бронхо-легеневій системі неспецифічного генезу нейтрофіліоз мав місце в кожному третьому випадку, що 2,5 рази вище, ніж при ТБ. І, навпаки, нейтропенія була втричі частішою саме у пацієнтів із туберкульозним процесом у легенях.

3. Запалення в бронхо-легеневій системі супроводжується вірогідним зростанням інтенсивності спонтанного апоптозу НФ та апоптозу НФ, індукованому МБТ, більш виразним при його туберкульозному генезі, що підтверджується й більш виразними проапоптичними властивостями аутосіроватки пацієнтів цієї групи.

4. При ТБ легень зміни процесів програмованої смерті НГ мають більш виразну патологічну спрямованість, ніж при загостренні ХОЗЛ, що має враховуватися як при проведенні комплексної оцінки стану імунологічної резистентності пацієнтів з даними патологіями, так і при визначенні терапевтичної тактики в кожному окремому випадку, особливо при використанні імуномодуляторів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апоптоз нейтрофилов / А. Н. Маянский, Н. А. Маянский, М. И. Заславская и соавт. // Иммунология. — 1999. — № 6. — С. 11–18.
2. Бахов Н. И., Майчук Ю. Ф., Корнев А. В. Концепция апоцитоза // Иммунология. — 1998. — № 3. — С. 62–64.
3. Белкин А. Д. Микобактерии в мембранной упаковке // Научная сессия посвященная 100-летию Новосибирска, 25–28 января 1994 г.: Тез. докл. Новосибирск, 1994. — С. 177.
4. Белкин А. Д. Новые звенья в патогенезе хронических инфекций // Врач. — 1997. — № 7. — С. 40–41.
5. Белушкина Н. Н. (n.d./2001). Роль апоптоза в патогенезе заболеваний. [WWW document]. URL <http://science-faculty.net.ru/lek/apoptosis.htm>
6. Інтенсивність поглинання нативних та опсонізованих мікобактерій фагоцитуючими клітинами in vitro у хворих на туберкульоз та хронічні неспецифічні захворювання легень / І. Ф. Ільїнська, О. М. Рекалова, Л. В. Арефєва, Ю. О. Матвієнко // Укр. пульмонолог. журн. — 2004. — № 4. — С. 42–47.
7. L-форми мікобактерій туберкульозу у хворих на хронічний деструктивний туберкульоз легень / М. Т. Клименко, К. Ф. Чернушенко, О. А. Журило та ін. // Укр. пульмонолог. журн. — 2000. — № 4. — С. 30–33.
8. Самуилов В. Д., Олескин А. В., Лагунова Е. М. (6 июня 2001). Программируемая клеточная смерть. [WWW document]. URL <http://cellimm.bio.msu.ru/edocs/samuilov-2.html> (20 августа 2001).
9. Спосіб визначення інтенсивності апоптозу нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові / Л. П. Кадан, О. А. Підгайна, Л. В. Арефєва, А. С. Фірсова // Лабораторна діагностика. — 2005. — № 3. — С. 49–52.
10. Частота та динаміка виділення L-форм мікобактерій туберкульозу у хворих з рецидивами туберкульозу легень / К. Ф. Чернушенко, М. Т. Клименко, О. А. Журило та ін. // Укр. хіміотерапевт. журн. — 2000. — № 3. — С. 17–20.
11. Хамазанова И. В. (14.05.2003). Гнойничковые заболевания кожи // Лечащий врач. — 2003. — № 4 [WWW document]. URL <http://old.osp.ru/doctore/2003/04/046.htm> (6 ltrf,hz 2006).
12. Ярлин А. А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. — 1996. — № 6. — С. 10–22.
13. Bonacini-Almeida M. G. Flow cytometry as a tool to identify Mycobacterium tuberculosis interaction with the immune System and drug Susceibility // J. Immunol. — 2000. — V. 95 (4), № 8. — P. 491–494.
14. Deretic V., Fratti R. A. Mycobacterium tuberculosis phagosome // Mol. Microbiol. — 1999. — V. 31, № 6. — P. 1603–1609.
15. Daffe M., Etienne G. The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity // Tuber. Lung. Dis. — 1999. — V. 79, № 3. — P. 153–169.
16. Dockrell D. H. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases // J. Infect. — 2001. — V. 42, № 4. — P. 227–234.
17. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by Mycobacterium tuberculosis / Kasahara K., Sato I., Ogura K. et al // J. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 178, № 1. — P. 127–137.
18. Fumarola C., Guidotti G. G. Stress-induced apoptosis: Toward a symmetry with receptor-mediated cell death // Apoptosis. — 2004. — V. 9. — P. 77–82.
19. Haslet C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation // Am. J. Crit. Care Med. — 1999. — V. 160. — P. 5–11.
20. Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils / J. M. Voyich, K. R. Braughton, D. E. Sturdevant et al. // J. Immunol. — 2005. — V. 175, № 6. — P. 3907–3919.
21. Kumar A., Zhang J., Yu F. S. Innate immune response of corneal epithelial cells to Staphylococcus aureus infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2004. — V. 45, No 10. — P. 3513–3522.
22. Mycobacterium tuberculosis-Induced Activation Accelerates Apoptosis in Peripheral Blood neutrophils from patients with Active Tuberculosis / M. Aleman, M. A. Saab, S. S. Barrera, M. Finiasz, E. Abbate, V. C. Sasian // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 2002. — V. 27. — P. 583–592.
23. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway / Perskvist N., Long M.,

- Stendahl O, Zheng L. // J. Immunol. — 2002. — V. 168, № 12. — P. 6358–6365.
24. *Staphylococcus aureus* Pantan-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils / A. L. Genestier, M. C. Michallet, G. Prevost et al. // J. Clin. Invest. — 2005. — V. 115, No 11. — P. 3117–3127.

АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛОЦИТІВ ТА ЙОГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В ЛЕГЕНЯХ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ТА НЕСПЕЦИФІЧНОГО ГЕНЕЗУ

*І. Ф. Ільїнська, О. М. Рекалова,
Л. В. Ареф'єва, О. В. Гриценко,
О. М. Зубрійчук*

Резюме

Розглянуті питання стосовно ролі апоптозу нейтрофілоцитів (НФ), індукованого екстра- та інтрацелюлярними патогенами, в патогенезі легеневого запалення туберкульозного та неспецифічного генезу. Його захисний характер, який спрямований на елімінацію збудника та поновлення кліткового гомеостазу макроорганізму був продемонстрований у хворих на ХОЗЛ із легеневим запаленням, яке було викликане екстрацелюлярними агентами. При запаленні в легенях, які викликані внутрішньоклітинними агентами, такими як МБТ, індукція програмованої смерті в інфікованих нейтрофілоцитах може бути використана в якості "троянського коня" — з метою експансії збудника та захисту від імунних механізмів організму хазяїна, що сприяє подальшому розвитку патологічного процесу. Показано, що у хворих на ХОЗЛ нейтрофіліоз спостерігається у кожного третього, що в 2,5 рази вище, ніж у хворих на туберкульоз. І, навпаки, нейтропенія має місце у 3 рази частіше саме у пацієнтів із туберкульозним запаленням в легенях.

Легеневе запалення супроводжується вірогідним ростом інтенсивності спонтанного апоптозу НФ і апоптозу НФ, індукованого МБТ, які більш виразні при туберкульозному процесі. Це підтверджувалося і більш суттєвим проапоптичним впливом ауто-сироватки цих пацієнтів. Таким чином, при туберкульозі легень зміни програмованої смерті НФ мають більш виражену па-

тологічну спрямованість, ніж при ХОЗЛ, що повинно враховуватися при проведенні комплексного імунологічного обстеження цих пацієнтів і визначенні терапевтичної практики в кожному конкретному випадку.

АПОПТОСІС OF NEUTROPHILIC LEUKOCYTES AND IT'S ROLE IN PATHOGENESIS OF TUBERCULOSIS AND NON-SPECIFIC PULMONARY INFLAMMATION

*I. F. Ilyinskaya, O. M. Rekalova, L. V. Arefyeva,
O. V. Grytsenko, O. N. Zubriyichuk*

Summary

The issues of the pathogenesis role of neutrophilic leukocytes apoptosis, induced by extra- and intracellular pathogens, in pathogenesis of tuberculosis of tuberculosis and non-specific pulmonary inflammation were reviewed. Its protective character, directed on pathogen elimination and recovery of macroorganism's homeostasis, was demonstrated in COPD (chronic obstructive pulmonary disease) patients with lung inflammation caused by extracellular agents. But in lung inflammation, caused by intracellular agents, such as MBT, the induction of programmed death of infected neutrophils can be used as "Trojan horse" in order to hide from host immune mechanisms, which contributes to the further development of the pathological process. It was shown, that in COPD patients the neutrophilia took place in each third case, that was 2,5 times higher, than in TB patients. And to the contrary, the neutropenia occurred 3 times more often in patients with tuberculosis inflammation in lungs.

The pulmonary inflammation was accompanied by the valid increase of spontaneous neutrophils apoptosis intensity and MBT induced apoptosis intensity, more expressed in tuberculosis process. It was confirmed by more expressive apoptogenic influence of auto-serum of these patients. Thus, in pulmonary tuberculosis the changes in neutrophil programmed death have a greater pathological direction, than in COPD. This should be considered during complex immunological observation and therapeutic approach to these patients.