

**О. Р. Панасюкова, К. Ф. Чернушенко, Л. П. Кадан, О. В. Іванкова,
А. С. Фірсова, В. М. Петішкіна**
АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

Національний Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського

Нині особливу увагу вчених біологів та медиків привертає проблема апоптозу — запрограмованої загибелі клітин. Апоптоз клітин імунної системи — обов'язковий фізіологічний механізм, який поряд із диференціацією та проліферацією забезпечує їх селекцію при формуванні і регуляції імунної відповіді, а також своєчасну їх елімінацію [1].

Відомо, що при туберкульозі суттєва роль належить нейтрофільним гранулоцитам (НГ). Вони є важливою ланкою уродженого імунітету завдяки формуванню першої лінії захисту від інфекції. Рядом авторів з'ясовано, що НГ прямо включаються в клітинний протитуберкульозний захист і знищують шляхом фагоцитозу значну кількість внесеної *in vitro* культури МБТ протягом однієї години [8]. Крім здійснення фагоцитозу та генерації різних субстанцій реактивного кисню, вони здатні регулювати запальну реакцію, піддаючись апоптозу. В експерименті було визначено, що інфікування МБТ людських НГ *in vitro* спричиняло швидку смерть цих клітин з характерними морфологічними та біохімічними ознаками апоптозу [9]. Крім того встановлено, що гранули апоптичних нейтрофілів подавляють ріст позаклітинних МБТ. Фагоцитоз апоптичних нейтрофілів макрофагами знижує життєздатність МБТ завдяки передачі антимікробних пептидів від нейтрофілів до макрофагів [7].

Життєвий цикл нейтрофілів короткий, включає етапи дозрівання у кістковому мозку, циркуляцію у крові і тканинах [3]. Нейтрофіли тканин та ексудатів відрізняються від клітин, які знаходяться у периферичній крові, більшою чутливістю до апоптогенних сигналів. У порівнянні з іншими популяціями клітин вони мають високу чутливість до апоптозу. Цим пояснюється їх короткий життєвий цикл.

Апоптоз НГ знижує токсичний потенціал клітин, усуває надлишок їх у вогнищах ураження і тим самим сприяє завершенню запального процесу у тканинах. Таким чином, апоптоз нейтрофілів можна розглядати як один із механізмів, що дозволяє контролювати запальні реакції [2, 4, 7].

Надмірність, недостатність або глибокі дефекти процесів апоптозу НГ можуть лежати в основі патогенезу багатьох захворювань, у тому числі туберкульозу, а також бути як наслідком самого патологічного процесу, так і сприяти його обтяженню. Однак невизначеними залишаються питання зв'язку інтенсивності апоптозу НГ з особливостями перебігу туберкульозу легень, клінічною формою патологічного процесу та ступенем функціональної активності клітин. Важливим є також вивчення можливості застосування показників інтенсивності апоптозу в якості прогностичних критеріїв для оцінки перебігу специфічного процесу.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження в динаміці лікування інтенсивності спонтанного та індукованого туберкуліном апоптозу нейтрофільних грануло-

цитів периферичної крові хворих на туберкульоз легень в залежності від особливостей клінічного перебігу (форми, ступеня інтоксикації, наявності бактеріовиділення, порожнин розпаду та їх загоєння) патологічного процесу та функціональної активності клітин, вивчення можливості використання отриманих даних для розробки діагностичних критеріїв прогнозу перебігу туберкульозу легень.

Матеріали і методи

Обстежений 21 хворий на вперше виявлений деструктивний туберкульоз легень, які проходили стаціонарне лікування у відділенні фтизіатрії інституту. Контрольну групу склали 20 здорових донорів крові. Переважно більшість обстежених становили особи у віці 18–40 років. У 14 (66,7) % хворих діагностовано інфільтративну форму туберкульозу легень, у 7 (33,3) % — дисеміновану. У всіх хворих до початку лікування активність процесу була підтверджена даними клініко-рентгенологічного і лабораторного досліджень.

Мікобактеріовиділення визначено у 15 осіб (71,4 %). У 4 із обстежених хворих перебіг специфічного процесу був без особливостей, тобто спостерігалась незначна інтоксикація, яка зникла на 1-му місяці лікування, припинення виділення МБТ відбувалося на 2-му, а загоєння каверн — на 2–4-му місяцях лікування; у 17 пацієнтів спостережено торпідний перебіг туберкульозу, при якому інтоксикація зникла на 2–3-му місяці, абацилювання — на 5-му місяці, а загоєння каверн — на 6–8-му місяцях лікування.

Для визначення ступеня важкості стану кожного конкретного хворого використовувався клінічний індекс інтоксикації (КІІ), який розраховувався за методом В. М. Фрайта [5]. Для цього симптоми інтоксикації (кашель, мокрота, слабкість, пітливість, анорексія, зниження ваги тіла, частота пульсу, підвищення температури) у хворих враховували в балах (0, 1, 2, 3).

Усім хворим було проведено імунологічне обстеження, яке включало оцінку функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів за їх поглинальною здатністю (підраховували процент фагоцитуючих клітин — ПФ) та рівнем кисеньзалежного метаболізму (НСТ-тест) [6]. Методику з визначення інтенсивності спонтанного та PPD-індукованого апоптозу НГ проводили наступним чином: чисту популяцію НГ виділяли з периферичної крові на подвійному градієнті фікол-верорафіну (щільністю 1,090 та 1,078 г/см³, відповідно). Інтенсивність спонтанного апоптозу визначали через 3 години після культивування клітин в середовищі 199 з 20 % сироваткою великої рогатої худоби при 37° С в лунках предметних скелець. Для визначення інтенсивності PPD-індукованого апоптозу НГ у робочій концентрації 30 мкг/мл. Оцінку результатів проводили під імерсійною системою мікроскопу при збільшенні ×900. Клітини, які знаходились у стані апоптозу диференціювали за характерними морфологічними ознаками: зменшенням розмірів клітин, конденсуванням їх цитоплазми, фрагментацією ядра на декілька округлих тілець.

Після перегляду 200 НГ підраховували відсоток апоптичних клітин. Дослідження проводили двічі — на початку антибактеріальної терапії (АБТ) та після проведення курсу лікування в стаціонарі.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методами варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

У хворих на туберкульоз легень на початку лікування виявлена тенденція до підвищення інтенсивності спонтанного апоптозу НГ ((21,7±2,3) % проти (16,3±1,8) % в групі здорових осіб) (табл. 1). Внесення туберкуліну в поживне середовище приводило до підвищення інтенсивності загибелі клітин шляхом апоптозу як у хворих до (46,1±3,7) %, P<0,05, так і у практично здорових осіб (з (16,3±1,8) % до (34,0±3,3) %, P<0,05). Після проведення курсу АБТ відбувалася нормалізація інтенсивності спонтанного і PPD-індукованого апоптозу НГ. Так, інтенсивність спонтанного апоптозу після лікування зменшилась до (14,5±2,0) %, P<0,05, рівень індукованого апоптозу — з (46,1±3,7) % знизився до (29,9±3,5) %, P<0,05.

Рівень спонтанного апоптозу розрізнявся у хворих із різними клінічними формами туберкульозу легень. У пацієнтів із дисемінованим процесом інтенсивність спонтанного апоптозу була вищою, ніж при інфільтративній формі туберкульозу і практично не змінювалась після лікування (табл. 1). Для інфільтративної форми було характерно менш суттєве підвищення апоптозу НГ на початку лікування та нормалізація наприкінці. Залежності інтенсивності індукованого апоптозу від форми процесу не виявлено.

На початку лікування інфільтративні зміни у легенях реєструвались у 95,2 % обстежених. АБТ привела до розсмоктування інфільтрації у легенях у всіх хворих та нормалізації інтенсивності як спонтанного (з (21,0±2,4) %

до (14,7±2,0) %, P<0,05) так і індукованого апоптозу НГ (з (46,8±3,9) % до (30,4±3,6) %, P<0,05).

Порожнини розпаду (CV +) діагностувалися у всіх обстежених хворих. У 13 (65,0 %) хворих паралельно з закриттям каверн нормалізувалась інтенсивність як спонтанного, так і індукованого апоптозу НГ. У 7 осіб (45,0 %) в процесі лікування каверни не загоїлись, рівень спонтанного апоптозу залишався високими, а індукованого — знижувався.

Вивчалась залежність інтенсивності апоптозу від наявності чи відсутності у хворих бактеріовиділення. Так, на початку лікування інтенсивність спонтанного апоптозу НГ у бактеріовидільовачів була вірогідно нижчою, ніж у осіб без бактеріовиділення ((19,1±3,0) та (27,2±1,8) % відповідно, P<0,05). У процесі лікування абацилювання спостерігалось у всіх хворих і супроводжувалось нормалізацією обох видів апоптозу НГ. У 6 (28,6 %) хворих, що не виділяли МБТ, висока інтенсивність спонтанного та індукованого апоптозу зберігалась на протязі всього курсу лікування.

За виразністю інтоксикаційного синдрому хворі розподілились наступним чином. На початку лікування у 13 (61,9 %) обстежених хворих симптоми інтоксикації були слабо виражені (KII 1 ступеня), а у 8 (38,1 %) з них — помірно (KII 2 ступеня). Комплексна терапія привела до зникнення симптомів інтоксикації у всіх хворих. Залежності інтенсивності спонтанного та індукованого апоптозу НГ від KII в динаміці лікування не виявлено.

З метою визначення прогностичного значення змін інтенсивності апоптозу для оцінки перебігу туберкульозного процесу був проведений аналіз показників спонтанного та PPD-індукованого апоптозу нейтрофільних гранулоцитів у хворих у залежності від перебігу захворювання. Обстежені були розподілені на дві групи. В I увійшли 13 пацієнтів (61,9) % зі сприятливим перебігом захворювання — у цих хворих спостерігалась позитивна динаміка

Таблиця 1

Залежність інтенсивності апоптозу НГ від клінічних факторів в динаміці лікування хворих на туберкульоз легень, (M±m)

Групи обстежених	Хворі до лікування			Хворі після лікування		
	n	Спонтанний апоптоз %	PPD-індукований апоптоз %	n	Спонтанний апоптоз %	PPD-індукований апоптоз %
Здорові особи	20	16,3±1,8	34,0±3,3	—	—	—
Хворі в тому числі:	21	21,7±2,3	46,1±3,7 *	21	14,5±2,0 *	29,9±3,5 *
на інфільтративний туберкульоз	14	21,9±2,7	46,1±4,5 *	14	11,1±1,5 *	26,5±3,5 *
на дисемінований туберкульоз	7	26,0±3,0 *	46,0±5,4 *	7	21,3±4,3 *	36,6±6,4
CV (+)	21	21,7±2,3	46,1±3,7*	7	19,8±3,7 *	36,8±5,5
CV (-)	—	—	—	13	10,6±1,4 **	24,7±3,9 *
МБТ (+)	15	19,1±3,0 *	46,0 + 5,1*	15	11,8±1,4 *	26,1±3,7 *
МБТ (-)	6	27,2±1,8 *	46,2±4,8*	6	21,3±5,2	39,4 + 6,6
KII I СТ.	13	21,4±3,3 *	45,9 + 5,1 *	13	15,6±2,9	30,3±4,4
KII 2 СТ.	8	22,3±2,1 *	46,5±4,7 *	8	12,8±2,2 *	29,3±5,9 *

Примітки: * — різниця показників відносно контролю вірогідна (p<0,05), * — різниця показників в динаміці лікування вірогідна (p<0,05), * — різниця показників між групами хворих з інфільтративним та дисемінованим туберкульозом вірогідна (p<0,05), * — різниця показників між групами хворих з CV (+) та CV(-) вірогідна (p<0,05), * — різниця показників між групами хворих з МБТ (+) та МБТ(-) вірогідна (p<0,05).

Таблиця 2

Залежність інтенсивності апоптозу НГ від їх функціонального стану в динаміці лікування хворих на туберкульоз легень, (M±m)

Групи	Хворі до лікування			Хворі після лікування		
	n	Спонтанний апоптоз %	PPD-індукований апоптоз %	n	Спонтанний апоптоз %	PPD-індукований апоптоз %
1	7	23,4±1,7 *	48,8 + 3,9 *	11	16,3±3,0 *	28,8±6,4 *
2	8	22,0±4,4 *	47,7±7,6	8	13,3±2,1	31,6 + 4,1
3	6	11,0±5,0 *	17,3±5,9 * *	1	12,0	20,0
4	4	23,0±1,5 *	53,3±1,5 *	3	13,0±2,0 *	36,0±6,0 *
5	17	21,3±2,3	44,1±4,3 *	18	14,6±2,3 *	29,0±3,8 *
Контрольна	20	16,3±1,8	34,0±3,3	—	—	—

Примітки: * — різниця показників відносно контролю вірогідна ($p < 0,05$), * — різниця показників в динаміці лікування вірогідна ($p < 0,05$), * — різниця показників між I та III групами. вірогідна ($p < 0,05$), * — різниця показників між IV та V групами вірогідна ($p < 0,05$).

клінічних симптомів (нормалізація температури, зникнення харкотиння, кашлю, задишки, нормалізація фізикальних проявів хвороби), основних показників ефективності лікування (припинення бактеріовиділення, загоєння каверн, порожнин розпаду). II групу склали 8 (38,1) % хворих із несприятливим перебігом хвороби — спостерігався або лише клінічний ефект, або залишалось бактеріовиділення, каверни.

Встановлено, що на початку лікування інтенсивність спонтанного апоптозу фагоцитуючих клітин у хворих I групи не відрізнялась від контрольних показників ((15,4±2,7) % та (16,3±1,8) % відповідно), а у пацієнтів II групи вона була вірогідно вищою як контрольних показників, так і даних хворих I групи ((25,4±3,3) % $P < 0,05$)).

Інтенсивність PPD-індукованого апоптозу НГ на початку лікування у хворих I групи вірогідно не відрізнялась від контрольних показників ((41,4±3,5) % та (34,0±3,3) %) і була нижче, ніж у пацієнтів II групи ((52,0±3,9) %, $P < 0,05$)). Після етапу лікування у хворих II групи рівень апоптозу вірогідно знизився до нормальних показників ((26,7±5,4) %, $P < 0,05$)). Тобто підвищена інтенсивність апоптозу фагоцитуючих клітин на початку лікування, може служити прогностичним критерієм несприятливого перебігу туберкульозного процесу.

Також досліджувався зв'язок між функціональною та апоптичною активністю НГ. Встановлено, що на початку лікування на фоні зниження активності НГ (ПФ — (43,9±2,9) % проти (56,9±3,8) % в контролі, $P < 0,05$), в клітинах спостерігається активація метаболічних процесів: НСТ-тест дорівнював (77,2±2,8) % при (61,6±4,1) % в контролі. По закінченню лікування хворих реєструвалась нормалізація поглинальної здатності клітин (53,9±3,3) %, але активність кисеньзалежного метаболізму залишалась високою (73,4±3,0) %. У залежності від фагоцитарної та метаболічної активності НГ хворі розподілені на наступні групи. В I увійшли 7 пацієнтів із нормальними показниками поглинальної активності НГ (ПФ — 65,0-53,0 %), II склали 8 хворих із помірним зниженням поглинальної здатності (ПФ 52,0-35,5 %), III — 7 хворих із суттєвим її пригніченням (35,4 % та нижче). IV групу склали 4 пацієнта з нормальними показниками кисеньзалежного метаболізму фагоцитів (НСТ-тест — 65,0—52,0 %), а у V увійшло 17 осіб із підвищеним НСТ-тестом — (70,0 % і вище).

Встановлено, що у пацієнтів I та II груп рівні спонтанного та індукованого апоптозу НГ перевищували контрольні показники (табл. 2). Після проведеної АБТ вони нормалізувались. В той же час у хворих III групи суттєве пригнічення поглинальної здатності супроводжувалось незначним зниженням спонтанного і різким — індукованого апоптозу, інтенсивність апоптозу у цих осіб залишалась низькою і після завершення лікування.

На початку лікування, незалежно від ступеня активації кисеньзалежного метаболізму НГ (IV і V групи хворих), рівні спонтанного апоптозу перевищували показники здорових осіб, які нормалізувались після лікування (табл. 2). Аналогічна динаміка спостерігалась з показниками індукованого апоптозу. Однак, слід зауважити, що інтенсивність його у осіб з нормальною активністю кисеньзалежного метаболізму клітин вірогідно перевищувала показник хворих з надмірною активацією метаболічної активності.

Висновки

У хворих на вперше виявлений туберкульоз легень на початку захворювання інтенсивність спонтанного апоптозу нейтрофільних гранулоцитів має тенденцію до підвищення. В умовах специфічної стимуляції апоптична загибель клітин посилюється. Комплексна АБТ приводить до нормалізації показників як спонтанного, так і індукованого апоптозу.

Визначено зв'язок інтенсивності спонтанного апоптозу нейтрофільних гранулоцитів із формою специфічного процесу — дисемінований туберкульоз супроводжується більш високим рівнем апоптозу, ніж інфільтративний.

Загоєння каверн супроводжується нормалізацією підвищеного апоптозу НГ. У пацієнтів, у яких залишаються порожнини розпаду, рівень апоптозу зберігається високим.

Інтенсивність спонтанного апоптозу у бактеріовидлювачів нижча, ніж у хворих без бактеріовиділення. У хворих із відсутністю МБТ висока інтенсивність спонтанного і індукованого апоптозу зберігається на протязі всього курсу лікування.

Встановлено зв'язок функціональної та апоптичної активності нейтрофілів. При відсутності значних функціональних порушень клітин висока інтенсивність спонтанного і індукованого апоптозу на початку лікування

нормалізується в процесі АБТ. Різде зниження поглинальної активності нейтрофілоцитів супроводжується низькою інтенсивністю їх апоптичної активності, незалежно від стадії лікування, а надмірна активація метаболічної активності супроводжується більш низьким рівнем індукованого апоптозу.

Таким чином, підвищений рівень апоптозу фагоцитуючих клітин на початку лікування може служити прогностичним критерієм несприятливого перебігу туберкульозного процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Апоптоз* в иммунологических процессах / Р.И. Сепиашвили, М. Г. Шубич, Н. В. Колесникова и др. // Аллергология и иммунология. — 2000. — Т. 1, № 1. — С. 15–23
2. *Маянский Н. А, Заславская М. И., Маянский А. Н.* Апоптоз эксцудативных нейтрофилов человека // Иммунология. — 2000. — № 2. — С. 11–13.
3. *Маянский Н. А.* Внутренний путь апоптоза нейтрофилов и механизмы антиапоптозного эффекта гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточная иммунология. — 2004. — № 6. — С. 329–335.
4. *Пичугин А. В., Ант А. С.* Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции // Проблемы туберкулеза. — 2005. — №. — С. 3–7.
5. *Фрайт В. М.* Математический метод оценки тяжести заболевания, анализа эффективности лечения и прогноза при диссеминированном и инфильтративном туберкулезе легких // Туберкулез: Респ. межвед. сб. — К., 1992. — Вып. 4. — С. 123–126.
6. *Унифицированные* иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендации / Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии. — Киев, 1988. — 18 с.
7. *Macrophages* acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens / В.Н. Tan, С. Meinken, М. Bastian et al. // J. Immunol. — 2006. — V. 177, № 3. — P. 1864–1871.
8. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway / N. Perskvist, M. Long, O. Stendahl et al. // J. Immunol. — 2002. — V.168, № 12. — P. 6358–6365.
9. *Tumor* necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils / K.O. Kisich, M. Higgins, G. Diamond et al. // Infect. Immun. — 2002. — V. 70, № 8. — P. 4591–4599.

АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

*О. Р. Панасюкова, К. Ф. Чернушенко,
Л. П. Кадан, О. В. Іванкова, А. С. Фірсова,
В. М. Петішкіна*

Резюме

Представлені дані вивчення інтенсивності апоптозу нейтрофілоцитів периферичної крові у 21 хворого на вперше виявлений туберкульоз легень у динаміці лікування в залежності від особливостей клінічного перебігу патологічного процесу та функціональної активності фагоцитуючих клітин. Встановлено, що на початку лікування інтенсивність спонтанного апоптозу має тенденцію до підвищення. В умовах специфічної стимуляції апоптична загибель клітин посилюється. Комплексна антибактеріальна терапія приводить до нормалізації показників апоптозу. Встановлено зв'язок інтенсивності апоптозу нейтрофілоцитів із формою специфічного процесу, наявністю чи відсутністю у хворих порожнин розпаду, мікобактеріовиділення. Виявлено взаємозв'язок функціональної та апоптичної активності нейтрофілів. Підвищений рівень апоптозу фагоцитуючих клітин на початку лікування може служити прогностичним критерієм несприятливого перебігу туберкульозного процесу.

APOPTOSIS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN LUNG TUBERCULOSIS PATIENTS

*O. R. Panasyukova, E. F. Chernushenko,
L. P. Kadan, E. V. Ivankova, A. S. Firsova,
V. M. Petishkina*

Summary

The data of blood neutrophilic granulocytes apoptosis intensity study, conducted in 21 newly diagnosed lung tuberculosis during the course of treatment (considering clinical course peculiarities and functional condition of phagocytes), have been presented. At the beginning of treatment spontaneous apoptosis intensity had the trend to increase. Under specific stimulation the apoptosis increased. There was revealed a correlation between apoptosis intensity and the variant of disease, the presence of destruction cavity and bacilli excretion. There was also an interrelation between functional and apoptosis activity of neutrophils. Augmented apoptosis level at the beginning of treatment served as prognostic criterion of unfavorable course of the disease.