

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИЗОСОМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МОЧЕ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННОЙ ОБСТРУКЦИЕЙ ВЕРХНИХ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ

Л.А. Мигаль, Г.Г. Никулина, И.Е. Сербина,
Д.А. Сеймивский, В.Ф. Петербургский

Диагностическая информативность (специфичность, чувствительность, эффективность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результата) определения N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (НАГ) и β-галактозидазы (β-ГАЛ) была оценена в моче 115 детей с врожденной обструкцией верхних мочевых путей. Перечисленные критерии в моче из почечной лоханки (мочеточника) были более значимыми, чем в моче из мочевого пузыря; с двусторонней патологией — более высокими, чем с односторонней; для активности НАГ — более значимыми, чем для β-ГАЛ, одновременное определение этих ферментов в комплексе повышает их диагностические характеристики.

DIAGNOSTIC INFORMATIVITY OF ENZYMOLOGIC INDICES OF LYSOSOMIC ETIOLOGY IN URINE OF CHILDREN WITH CONGENITAL OBSTRUCTION IN URINARY TRACTS

L. Ya. Myhal, G. G. Nikulina, I. Ye. Serbina,
D. A. Seimivsky, V. F. Peterburgsky

The diagnostic informativity (specificity, sensitivity, efficacy, prognostic value of positive and negative result) in determining N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) and β-galactosidase (β-GAL) was measured in urine of 115 children having congenital obstruction in upper urinary tracts. The above criteria in urine from renal pelvic (ureter) were higher than those from urinary bladder; in case of bilateral pathology they were higher than with unilateral; for NAG activity — more important than for β-GAL. The simultaneous determination of these enzymes in complex elevates considerably their diagnostic characteristics.

УДК 612.112.3:577.7:576.852.211

І.Ф. Ільїнська, О.М. Зубрійчук

ВПЛИВ ІНТОКСИКАЦІЇ НА АПОПТОЗ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗІ

ДУ “Національний інститут фізіотрії
і пульмонології імені Ф.Г. Яновського
Національної академії медичних наук України”,
м. Київ, Україна

Апоптоз фагоцитуючих клітин при туберкульозі (ТБ), як і більшість імунологічних механізмів, має дуалістичне патогенетичне значення: з одного боку, він виступає головним регулятором

імуної відповіді на збудник, а з іншого призводить до імунологічної недостатності [9] та сприяє розповсюдженню мікобактерій туберкульозу (МБТ) в макроорганізмі і забезпечує їх тривалу персистенцію [1, 5]. Дослідженнями останніх років було встановлено, що інтенсивність програмованої смерті (ПС) нейтрофілів (Нф), моноцитів (Мц) і макрофагів при ТБ залежить як від біологічних властивостей МБТ, таких як вірулентність, життєздатність та бактеріальне навантаження [4, 5, 12] так і від стану організму хазяїна, в першу чергу його генетичної сприйнятливості до цієї інфекції [2, 3, 14].

Ще одним фактором, який може істотно впливати на апоптоз фагоцитуючих клітин при ТБ є інтоксикація. Відомо, що МБТ самі не виділяють екзотоксинів, ендотоксинів чи гістолітичних ферментів, тому при первинному інфікуванні явища інтоксикації та ушкодження тканин, як правило, відсутні [7, 8]. Саме імунні механізми лежать в основі деструктивних процесів, лихоманки та втрати ваги у хворих. Вважається, що вони відносяться до патологічних ефектів фактору некрозу пухлини-альфа (TNF-α), продукція якого залежить від балансу Т-хелперів I та II типів [13]. Відомо, що TNF-α виступає одним з головних цитокінів, який запускає ПС багатьох типів клітин (так званий АРО-1 шлях), у т.ч. фагоцитуючих [12]. Тому метою даної роботи, виконаної за кошти держбюджету, було вивчення особливостей апоптозу Нф та Мц крові у хворих на ТБ в залежності від наявності та виразності інтоксикації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В дослідженні використовували Нф та Мц периферичної крові (ПК) 160 хворих на ТБ легень віком від 18 до 82 років (з них 81 чоловік та 69 жінок), котрі перебували на стаціонарному лікуванні в ДУ “Національний інститут фізіотрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського Національної академії медичних наук України” і перед початком лікування проходили обстеження у лабораторії клінічної імунології, а також фагоцитуючі клітини ПК 28 волонтерів без клінічних ознак інфекційної та соматичної патології віком від 20 до 56 років.

Ступінь інтоксикації хворих (0, I, II, III) визначали математичним методом В.М. Фрайта [11] за такими клінічними ознаками, як наявність та характер кашлю і мокротиння, слабкість, пітливість, анорексією, зниженням ваги тіла,

частотою пульсу, підвищенням температури тіла, тощо. За даними лейкограми встановлювали відносний та абсолютний вміст клітин у ПК та розраховували лейкоцитарний індекс інтоксикації (I/ЛІ) за формулою, запропонованою Ю.С. Солодовником та співав. [10]:

$$I/ЛІ = ПК \times (4ми + 3ю + 2п + с) \times \\ \times (пл + 1) / (Лф + Мц + Еф + 1),$$

де мі — % мієлоцитів; ю — % юних клітин; п — % паличкоядерних клітин; с — % сегментоядерних клітин; пл — % плазматичних клітин; Лф — % лимфоцитів; Мц — % моноцитів; Еф — % еозинофілів; 1, 2, 3, 4 — коефіцієнти; ПК — поправочний коефіцієнт (ПК — визначається за вмістом лейкоцитів: 1...2·10⁹/л — 0,2; 2...3·10⁹/л — 0,4; 3...4·10⁹/л — 0,6; 4...5·10⁹/л — 0,8; 10...11·10⁹/л — 1,3; 11...12·10⁹/л — 1,4; 12...13·10⁹/л — 1,5; 13...15·10⁹/л — 1,8).

Чисті популяції Нф та Мц отримували шляхом їх послідовного розділення у двох градієнтах щільності фікол-верографіну (1,090 г/см³ та 1,078 г/см³) стандартною технікою і використовували у робочій концентрації 1,0...2,0·10⁹/л. Вміст апоптичних Нф визначали у цитоспинових препаратах [1]. Інтенсивність спонтанного апоптозу адгерентних Нф та Мц оцінювали шляхом їх інкубації протягом 2 год. у лунках предметних скелець з обмежувальними кільцями у повному поживному середовищі RPMI з додаванням антибіотиків, ембріональної телячої сироватки (ЕТС) та NERES у вологій атмосфері при 37°C. Для встановлення впливу гуморальних факторів на апоптоз Нф та Мц у поживне середовище замість ЕТС додавали 20% ауто-сироватки [1]. Облік результатів проводили за морфологічними ознаками: апоптичною вважали клітини з чітко фрагментованими ядрами й ущільненою оболонкою.

Зберігання даних та їх статистичну обробку здійснювали на ПК Intel® Celer з використанням ліцензійних програмних продуктів, що входили до пакету Microsoft Office Professional 2000, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 17016297: після підтвердження нормальності розподілу показників використовували параметричні методи варіаційної статистики з визначенням середніх значень (M) та їх помилок (m), достовірність різниці між ними підтверджувалася за t-критерієм Ст'юдента (за мінімальний поріг достовірності було обрано значення p<0,05). Також проводили кореляційний аналіз, під час якого визначали наявність кореляційних зв'язків (r), їх похибку, силу та достовірність (t) [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі отриманих даних було з'ясовано, що лейкоцитоз мав місце лише у групі хворих на ТБ з виразним інтоксикаційним синдромом, тоді як в інших групах збільшення середнього вмісту лейкоцитів не спостерігалось (табл. 1). Попри наявність при ТБ достовірного кореляційного зв'язку середньої сили між ступенем інтоксикації і абсолютною чисельністю Нф (r=0,37±0,08; p<0,001) в жодній групі хворих зростання середньої кількості нейтрофілів у ПК виявлено не було, а у пацієнтів з відсутністю клінічних ознак інтоксикації цей показник взагалі виявився у 1,5 рази нижчим від контрольного. В той же час в усіх групах хворих з інтоксикацією було зафіксовано достовірне збільшення кількості апоптичних Нф (до 1,10...1,54·10⁹/л) та посилення спонтанного апоптозу цих клітин (табл. 1). Слід зазначити, що інтенсивність спонтанного апоптозу Нф при інтоксикації I ступеня була достовірно вищою, ніж у пацієнтів з виразним інтоксикаційним синдромом і сягала 50,1±2,6%. Проте у присутності ауто-сироватки такої тенденції знайдено не було (табл. 1).

Відомо, що сироватка крові містить як індуктори апоптозу, так і його інгібітори [9, 12]. Індивідуалізований аналіз впливу ауто-сироватки на апоптоз Нф ПК при ТБ продемонстрував її переважно проапоптичний вплив в усіх групах обстежених хворих (від 50 до 85,7%), і лише у пацієнтів з інтоксикацією I ступеня посилення і послаблення ПС Нф спостерігалось з однаковою частотою — у половини обстежених, що вирізняло цю групу серед усіх інших (рис.).

При ТБ було виявлено зростання вмісту Мц у ПК у 1,5–2,0 рази, яке від наявності та ступеня інтоксикації не залежало. Звертає на себе увагу те, що моноцитоз у пацієнтів без клінічних ознак інтоксикації не супроводжувався посиленням спонтанного апоптозу цих клітин. Апоптоз Мц ПК у присутності ауто-сироватки у хворих цієї групи також виявився найнижчим (15,0%±2,7%) і достовірно відрізнявся як від контролю (29,4%±1,6%), так і від показників трьох інших дослідних груп. Проте при індивідуалізованому аналізі впливу ауто-сироватки на апоптоз Мц ПК цих пацієнтів у 57% випадків встановлено її проапоптичну дію, що достовірно не різнилося від аналогічного показника в інших групах (рис.).

Ці результати підтверджувалися результатами кореляційного аналізу, яким при ТБ між ступе-

Вміст фагоцитуючих клітин та апоптоз цих клітин у хворих на туберкульоз легень
в залежності від ступеня інтоксикації (M±m)

Показники	Групи обстежених				
	Здорові особи (n=28)	Хворі на туберкульоз з інтоксикацією:			
		0 ступеня (n=24)	I ступеня (n=37)	II ступеня (n=43)	III ступеня (n=56)
Вміст:					
лейкоцитів (10 ⁹ /л)	8,1±0,5	7,0±0,6	8,1±0,3	8,2±0,3*	9,3±0,5* ^{°#}
нейтрофілів (%)	51,5±2,4	39,9±3,0*	40,9±2,0*	46,0±2,3 [°]	45,0±2,1*
(10 ⁹ /л)	4,07±0,32	2,79±0,40*	3,39±0,26	4,01±0,29*	4,39±0,38 [°]
апоптичних нейтрофілів (%)	20,0±1,7	29,3±2,5*	31,1±1,8*	25,5±1,7 [°]	24,2±1,6 [°]
(10 ⁹ /л)	0,70±0,09	0,85±0,16	1,10±0,12*	1,54±0,15*	1,10±0,13*
моноцитів (%)	2,6±0,2	5,4±0,9*	3,8±0,3*	4,3±0,5 [°]	3,9±0,3*
(10 ⁹ /л)	0,19±0,02	0,39±0,10*	0,33±0,03*	0,34±0,04*	0,34±0,03*
Спонтанний апоптоз:					
нейтрофілів (%)	32,6±2,3	43,8±4,7*	50,1±2,6*	39,7±3,4 [°]	41,9±2,8 [°]
моноцитів (%)	21,0±2,2	18,3±3,1	33,5±3,2**	34,0±2,6**	31,3±3,4**
Апоптоз у присутності аутосерватки:					
нейтрофілів (%)	24,6±1,6 [#]	40,0±2,8*	33,0±3,0**	36,1±2,5*	40,6±2,9*
моноцитів (%)	29,4±1,6 [#]	15,0±2,7*	30,6±5,4*	32,9±7,3*	25,2±3,3*

Примітки. * — різницю показника у порівнянні з показником здорових осіб статично підтверджено (p<0,05); • — різницю показника у порівнянні з показником хворих на туберкульоз без інтоксикації статично підтверджено (p<0,05); ° — різницю показника у порівнянні з показником хворих на туберкульоз з інтоксикацією I ступеня статично підтверджено (p<0,05); # — різницю показника у порівнянні з показником спонтанного апоптозу статично підтверджено (p<0,05).

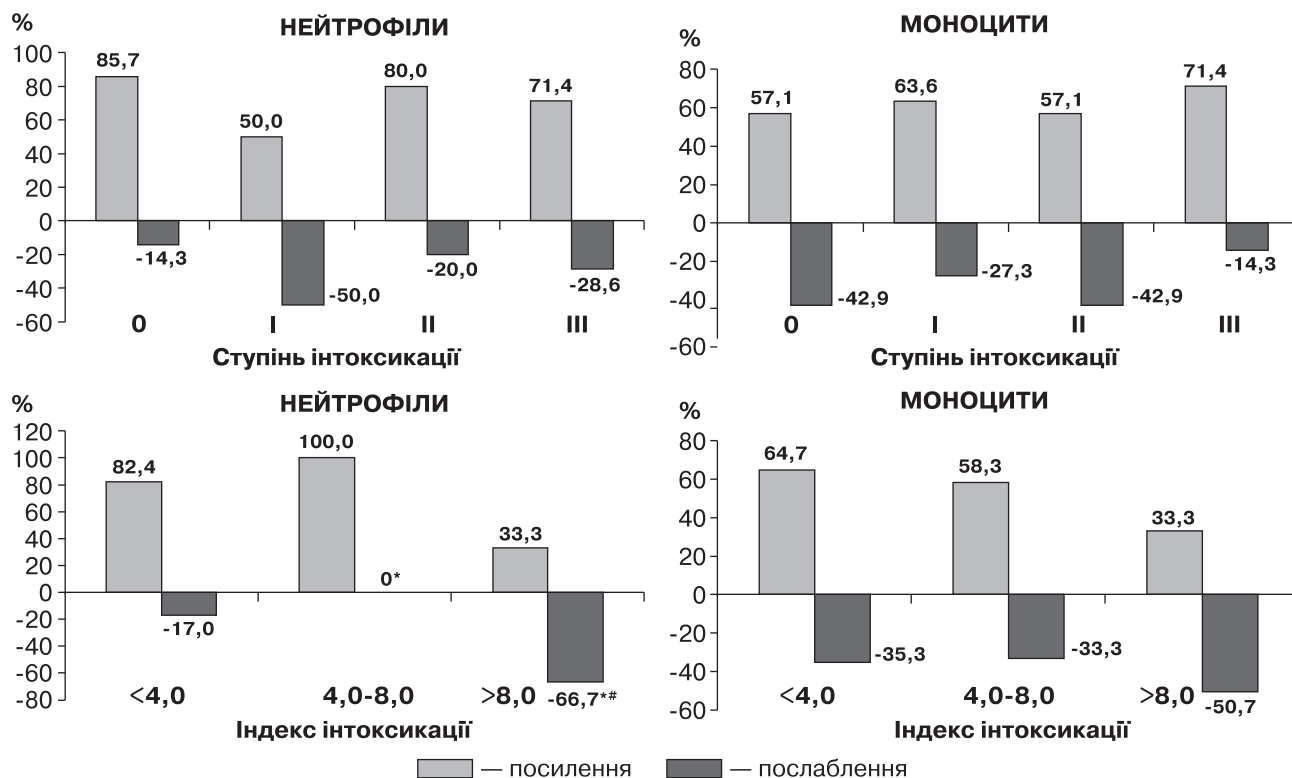


Рис. Вплив аутосерватки на апоптоз нейтрофілів та моноцитів периферичної крові у хворих на туберкульоз з різним ступенем та індексом інтоксикації, де: 0–II — ступінь інтоксикації; 4,0–8,0 — лейкоцитарний індекс інтоксикації

Вміст і апоптоз фагоцитуючих клітин у хворих на туберкульоз легень в залежності від лейкоцитарного індексу інтоксикації

Показники (M±m)	Здорові особи (n=28)	Хворі на туберкульоз з лейкоцитарним індексом інтоксикації:		
		до 4,0 (n=69)	4,1–8,0 (n=67)	вище 8,0 (n=24)
Вміст:				
лейкоцитів (10 ⁹ /л)	8,1±0,5	6,8±0,2*	8,8±0,3*•	11,5±0,9*•°
нейтрофілів (%)	51,5±2,4	38,9±1,2*	44,6±1,6*	50,7±3,8*
(10 ⁹ /л)	4,07±0,32	2,65±0,12*	4,12±0,21	6,37±0,42*•°
апоптичних нейтрофілів (%)	20,0±1,7	27,5±1,5*	26,6±1,5*	29,8±2,5*
(10 ⁹ /л)	0,70±0,09	0,73±0,05	1,12±0,10*•	1,84±0,28*•°
моноцитів (%)	2,6±0,2	3,7±0,4	3,8±0,3	4,8±0,7
(10 ⁹ /л)	0,19±0,02	0,24±0,02	0,32±0,03*•	0,54±0,11*•°
Спонтанний апоптоз:				
нейтрофілів (%)	32,6±2,3	45,1±2,7*	45,2±2,5*	42,0±3,8*
моноцитів (%)	21,0±2,2	26,2±3,1	30,7±3,3*	28,6±3,4*
Апоптоз у присутності ауто-сироватки:				
нейтрофілів (%)	24,6±1,6 [#]	39,5±4,2*	41,7±5,2*	26,4±3,2*•° [#]
моноцитів (%)	29,4±1,6 [#]	24,6±3,4	30,8±4,7	17,4±2,1*•° [#]

Примітка. * — різницю показника у порівнянні з показником здорових осіб статично підтверджено (p<0,05); • — різницю показника у порівнянні з показником хворих з малим індексом інтоксикації статично підтверджено (p<0,05); ° — різницю показника у порівнянні з показником хворих з середнім індексом інтоксикації статично підтверджено (p<0,05); # — різницю показника у порівнянні з показником спонтанного апоптозу статично підтверджено (p < 0,05).

нем інтоксикації та показниками спонтанного апоптозу Мц було виявлено наявність зворотного достовірного кореляційного зв'язку малої сили ($r=0,20\pm 0,09$; $p<0,05$) та відсутність кореляції між ступенем інтоксикації та апоптозом Мц при їх інкубації з ауто-сироваткою.

З огляду на те, що ПС виступає одним з головних регуляторів чисельності клітин імунного захисту при ТБ, визначення вмісту апоптичних Нф було проведено у хворих з низьким (до 4 у.о.), середнім (4–8 у.о.) та високим (понад 8 у.о.) І/Іл.

Аналіз отриманих даних показав достовірне збільшення абсолютної чисельності апоптичних Нф ПК у пацієнтів по мірі зростання у них І/Іл (табл. 2). Це підтверджувалося кореляцією середньої сили між даними показниками ($r=0,43\pm 0,08$; $p<0,001$) і супроводжувалося посиленням спонтанного апоптозу цих клітин. Проте будь-яких відмінностей останнього в цих групах виявлено не було. У присутності ауто-сироватки апоптоз Нф ПК у хворих з малими та середніми І/Іл перевищував аналогічний показник здорових осіб і не відрізнявся від контролю в групі пацієнтів з високими І/Іл (табл. 2). Дійсно, в групах з

малим та середнім І/Іл проапоптичний вплив ауто-сироватки на Нф було визначено відповідно у 82,4% та 100,0% випадків, тоді як у хворих на ТБ з високим І/Іл — всього у 33,5% ($p<0,02$), а у решти 66,7% під впливом гуморальних факторів спостерігалось послаблення апоптозу Нф (рис.).

При аналізі показників спонтанного апоптозу Мц ПК у хворих на ТБ було виявлено його посилення у хворих з середніми та високими індексами інтоксикації: до 30,7%±3,3% та 28,6±3,4%, відповідно; $p<0,05$ (табл. 2). Також було встановлено, що при зростанні індексу інтоксикації відбувалося зменшення частоти проапоптичного впливу ауто-сироватки на Мц та зростання частоти її антиапоптичної дії на ці клітини, що, на наш погляд має адаптаційний характер.

ВИСНОВКИ

При туберкульозі відбувається зростання вмісту апоптичних нейтрофілів, яке прямо пропорційне І/Іл.

При наявності інтоксикації у хворих на туберкульоз має місце посилення спонтанного апоптозу нейтрофілів та моноцитів периферич-

ної крові, яке від ступеня та індексу інтоксикації не залежить.

При зростанні індексу інтоксикації у хворих на туберкульоз відбувається зменшення частоти проапоптичного впливу ауто-сироватки на нейтрофли та моноцити периферичної крові та зростання частоти її антиапоптичної дії на ці клітини, що має адаптаційний характер.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апоптоз нейтрофілоцитів та його роль в патогенезі запальних процесів в легенях туберкульозного та неспецифічного генезу / І.Ф. Льїнська, О.М. Рекалова, Л.В. Ареф'єва [та ін.] // Укр. пульмон. журнал. — 2007. — № 2. — С. 32–38.
2. Генетический контроль восприимчивости к туберкулезу и его иммунологические аспекты [Текст] / А.С. Ант, Т.В. Радаева, Б.В. Никоненко, И.В. Лядова // Медицинская иммунология. — 2003. — Т. 5, № 3–4. — С. 466.
3. Льїнська І.Ф. Апоптоз перитонеальних макрофагів у тварин з різною генетичною чутливістю до туберкульозу // І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук // Вісник проблем біології і медицини. — 2012. — 3 1. — С. 119–123.
4. Льїнська І.Ф. Інфікованість мікобактеріями туберкульозу та індукований ними апоптоз фагоцитуючих клітин при туберкульозі / І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук // Укр. Пульман. Журн. — 2009. — № 1. — С. 33–36.
5. Льїнська І.Ф. Механізми імуносупресії при туберкульозі / І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук, С.Г. Ясир // Лаб. діагностика. — 2011. — № 3. — С. 47–58.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
7. Нореико Б.В. Ранний период туберкулезной инфекции у детей / Б.В. Нореико // Здоровье ребенка. — 2008. — № 5 (14). — С. 132–134.
8. Нореико Б.В. Первичный туберкулезный комплекс / Б.В. Нореико, Т.М. Шумляева, А.В. Кирилова // Здоровье ребенка. — 2009. — № 3 (18). — С. 83–85.
9. Пичугин А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин, А.С. Ант // Пробл. туберкулеза и заболеваний легких. — 2005. — № 12. — С. 3–7.
10. Солодовник Ю.С. Определение лейкоцитарного индекса интоксикации у больных туберкулезом легких / Ю.С. Солодовник, В.П. Бондаренко // Врачебное дело. — 1986. — № 11. — С. 23–24.
11. 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.
12. Lee J. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis / J. Lee, M. Hartman, H. Kornfeld // Yonsei Med. J. — 2009. — Vol. 50, № 1. — P. 1–11.
13. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis / St. Winkler, M. Necek, H. Winkler [et al.] // Microbes and Infection. — 2005. — Vol. 7, № 9–10. — P. 1161–1169.
14. Schurr E. Genetic control of host susceptibility to tuberculosis / E. Schurr, I. Kramnik // Handbook of Tuberculosis. Immunology and Cell Biology / Eds S.H.E. Kaufmann, W.J. Britton. W.J. Weinheim: WILEY-VCH, 2008. — P. 295–336.

ВЛИЯНИЕ ИНТОКСИКАЦИИ НА АПОПТОЗ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

И.Ф. Ильинская, О.Н. Зубрийчук

Изучение особенностей апоптоза нейтрофилов и моноцитов крови в зависимости от наличия и выраженности интоксикации было проведено у 160 больных туберкулезом (ТБ) легких и 28 здоровых волонтеров. Установлено, что при ТБ содержание апоптичных нейтрофилов в крови увеличивается прямо пропорционально лейкоцитарному индексу интоксикации, однако усиление спонтанного апоптоза фагоцитов крови у больных с интоксикацией от ее степени и лейкоцитарного индекса интоксикации не зависит. Показано, что у пациентов рост индекса интоксикации сопровождается увеличением частоты антиапоптического действия аутосыворотки, что является адаптационным механизмом в патогенезе туберкулеза.

EFFECT OF INTOXICATION ON THE APOPTOSIS OF PHAGOCYtic CELLS IN TUBERCULOSIS

I.F. Ilyinskaya, O. N. Zubriyчук

The features of blood neutrophils and monocytes apoptosis, depending on the presence and severity of intoxication were studied in 160 patients with pulmonary tuberculosis and 28 healthy volunteers. It was detected that the content of TB apoptic neutrophils in the blood increases in direct proportion to leukocyte intoxication index, but increasing of spontaneous apoptosis of blood phagocytes in patients with intoxication doesn't dependent of its degree and leukocyte intoxication index. It was shown that in TB patients the growth of intoxication indexes accompanied by increase of the frequency of antiapoptic influence of autologic serum on neutrophils and monocytes and that is an adaptive mechanism in TB pathogenesis.

УДК 577.16.02:612.015.6:616-092.19

Е.П. Пасічна¹, Г.В. Донченко¹,
А.П. Бурлака², Н.В. Делеменчук¹

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ВІТАМІНАМИ

¹ Інститут біохімії імені О.В. Палладіна
НАН України, м. Київ

² Інститут експериментальної патології, онкології
та радіобіології імені Р.Є. Кавецького, м. Київ

Розсіяний склероз (РС) — хронічне запальвальне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується локально та дифузно розташованими осередками демієлінізації та нейродегенерації [15]. Молекулярні механізми виникнення й розвитку цієї хвороби і