

УДК 576.36:616-002-02:616.248.

Р.С. БАЙРАМОВА

/Азербайджанский медицинский университет, Баку/

Исследование апоптоза и некроза нейтрофилов индуцированной мокроты у больных хроническим обструктивным заболеванием легких

Резюме

Дослідження апоптозу і некрозу нейтрофілів індукованого харкотиння у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень

Р.С. Байрамова

Апоптоз і некроз – дві основні форми загибелі клітин. Перший з них – це біохімічний специфічний тип загибелі клітин, що характеризується активацією нелізосомних ендогенних нуклеаз, які призводять до розщеплення ядерної ДНК на дрібні фрагменти. Це енергозалежний процес, за допомогою якого видаляються небажані та дефектні клітини організму. Апоптоз відіграє велику роль у морфогенезі і є механізмом постійного контролю гомеостазу.

Некроз клітини характеризується, перш за все, зміною структури ядра. Принципова відмінність апоптичної загибелі клітин полягає у тому, що при апоптозі, на відміну від некрозу, не відбувається порушення цілісності клітинної оболонки, і апоптоз ніколи не супроводжується запальною реакцією.

Нині в літературі активно обговорюється роль апоптозу і некрозу нейтрофільних клітин в нормі і при різноманітних патологічних станах.

Вивчено апоптотичні і некротичні зміни нейтрофілів в індукованому харкотинні у 121 хворого на хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) залежно від етіологічних агентів загострення захворювання. Як контроль було обстежено 26 практично здорових осіб. Показано, що у випадку наявності грам-позитивної моноінфекції при загостренні ХОЗЛ, показники апоптозу нейтрофілів у пацієнтів суттєво перевищували такі в контролі, а при загостренні ХОЗЛ, що обумовлено грам-негативною бактеріальною мікрофлорою, апоптоз нейтрофілів мав мінімальне значення.

У всіх хворих на ХОЗЛ було виявлено підвищення кількості некротизованих нейтрофілів у харкотинні. При цьому у хворих із загостренням, зумовленим грам-негативною бактеріальною моноінфекцією, кількість некротизованих нейтрофілів виявилась вищою, ніж в групі хворих з моноінфекцією, обумовленою грам-позитивними бактеріями.

Привертає увагу той факт, що при загостренні у хворих на ХОЗЛ, етіологічним фактором якого було інфікування кандидо-бактеріальною мікрофлорою, наявне підвищення кількості нейтрофілів як з апоптичними, так і з некротичними змінами.

Ключові слова: ХОЗЛ (хронічне обструктивне захворювання легень), індуковане харкотиння, апоптоз і некроз нейтрофілів, моно- та змішана інфекції, грам-позитивні та грам-негативні бактерії

Summary

Study Apoptosis and Necrosis Neutrophils Induced Sputum of Patients with COPD

R.S. Bayramova

Apoptosis and necrosis – two basis forms of cell destruction. First of them – is biochemical specific type destruction cells, which of characterized by activation nonlysosomal endogen nuclease, that splitted nuclear DNA into small fragments. Morphologically it manifestes destruction of cell that accompanied formulation roundish, surrounding by membrane gland formation, which of phagocytized by environment cells. It is energo-dependent process by means of eliminated undesirable and defect cells from organism. Apoptosis have major role in morphogenesis and presented the mechanism of continual control of homeostasis. During of it decrease takes place the accumulation of cells (e.g., tumor growth), in the time of increasing the progressive decrease quantity of cells. Increased (pathologic) apoptosis cells of immune system, caused by effect of opportunistic microorganism, may be basis of secondary immunodeficiency.

Necrosis of cells, first of all, characterized by changes of nucleus struction. Chromatin of dead cell condensates in large blocks, nucleus diminished in volume, becomes no smooth, compact, intense basophilic, i.e. dyed in dar-blue light by hematocilin. The principal difference of apoptotic death with distinction of necrosis consist of that in apoptosis did not disturbed integrity, cell membrane, and apoptosis non accompanied never with inflammation. Necrosis of cells accompanied disturbing, that result into free contents of cell, as a rule the development of inflammation. At present in literature actively discussed role apoptosis and necrosis of neutrofil cells in norm and in different pathologic states. In our study were investigated apoptotic and necrotic disorders.

Apoptotic and necrotic disorders of neutrophils induced sputum have been studied in 121 patient during aqqravation of COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) depending of its etiologic agents. It was revealed significantly increase number of apoptotic neutrophils in patients during aqqravation of COPD by Gram-positive bacterial monoinfection in comparison with control group. But apoptosis of neutrophils in these patients during their aggravation by Gram-negative bacterial infection had minimal meaning.

All of patients with COPD it was shown the increasing numbers of necrotized neutrophils in sputum. But in patients aqqravated by Gram-negative bacterial monoinfection the quantity necrotized neutrophils was more than in group of patients aqqravated by Gram-positive bacteria.

It was also established, that during aqqravation of patients COPD by mixed *Candida*-bacterial infection the quantity both apoptotic and necrotized neutrophils have been increased.

Key words: COPD, induced sputum, apoptosis and necrosis of neutrophils, mono- and mixed infections, Gram-negative, Gram-positive bacteria

Известно, что существуют две основных формы клеточной гибели: апоптоз и некроз. Апоптоз – это биохимический специфический тип гибели клеток, характеризующийся активацией

нелизосомных эндогенных эндонуклеаз, которые расщепляют ядерную ДНК на мелкие фрагменты. Морфологически апоптоз проявляется гибелью клеток, сопровождается формированием

округлых, окруженных мембраной образований, так называемых «апоптотических телец», которые фагоцитируются окружающими клетками [5, 6, 7]. Это энергозависимый процесс, посредством которого удаляются нежелательные и дефектные клетки организма. Он играет большую роль в морфогенезе и является механизмом постоянного контроля гомеостаза [2, 3, 7]. При снижении апоптоза происходит накопление клеток (например, опухолевый рост), при его повышении – прогрессивное уменьшение количества клеток. Повышенный (патологический) апоптоз клеток иммунной системы, вызванный действием условно-патогенных микроорганизмов, может быть основой вторичного иммунодефицита.

Некроз клетки характеризуется, прежде всего, изменением структуры ядра. Хроматин мертвой клетки конденсируется в крупные глыбки. Ядро уменьшается в объеме, становится сморщенным, плотным, интенсивно базофильным, т.е. окрашивается в темно-синий цвет гематоксилином. Этот процесс назван кариопикнозом (сморщиванием).

Принципиальное различие апоптотической гибели клетки от некротической состоит в том, что при апоптозе, в отличие от некроза, не нарушается целостность клеточной оболочки, и апоптоз никогда не сопровождается воспалительной реакцией. Некроз клеток сопровождается нарушением проницаемости клеточной оболочки с последующим ее разрушением, что приводит к высвобождению содержимого клетки в окружающую среду, повреждению клеток-свидетелей и, как правило, развитию воспалительной реакции [1, 4, 5, 11].

В настоящее время в литературе активно обсуждается роль апоптоза и некроза нейтрофильных клеток в норме и при различных патологических состояниях [8, 10, 11, 12]. Вопрос относительно особенностей апоптоза и некроза нейтрофилов в индуцированной мокроте у больных хроническим обструктивным заболеванием легких (ХОЗЛ) недостаточно изучен.

Цель представленной работы – изучение в индуцированной мокроте у больных ХОЗЛ апоптоза и некроза нейтрофилов.

Материалы и методы исследований

Осуществление поставленных задач проводилось путем комплекса клинико-микробиологических и иммунологических исследований 121 больного с обострением хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ). Большинство больных были мужчины, возраст пациентов составлял от 61±5,2 до 64±6,3 года. Среди факторов, предрасполагающих к развитию ХОЗЛ, основное место занимало длительное интенсивное курение (более 10 сигарет в день), профессиональные вредности, а также ассоциация различной грам-положительной и грам-отрицательной бактериальной микрофлоры (*H.influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Ps.aeruginosa*,

Kl. pneumoniae и др.) с *C. albican*, что обуславливало частое и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов, а также лечение кортикостероидами.

Среди обследуемых лиц было выделено 5 групп. Первую (контрольную) группу составили 26 человек, не имевших хронической легочной патологии, не принимавших перед обследованием на протяжении предшествующих 3 месяцев антибактериальных, гормональных и цитостатических препаратов, без вредных привычек и профессиональных вредностей. Микроорганизмы в индуцированной мокроте у данной группы пациентов не выявлялись. Во II группу были включены больные с обострением ХОЗЛ, которое было вызвано грам-положительными бактериальными агентами, группа III состояла из пациентов, у которых обострение ХОЗЛ было вызвано грам-положительными бактериями в ассоциации с *C. albicans*. В IV группу были включены больные с обострением ХОЗЛ, этиологическим фактором которого были грам-отрицательные бактерии. Группу V составили пациенты, в этиологии обострения заболевания которых имела место грам-положительная бактериальная микрофлора в ассоциации с *C. albicans* (таблица).

Количество апоптотически измененных и некротизированных нейтрофилов в индуцированной мокроте больных ХОЗЛ было определено в зависимости от этиологического фактора, вызвавшего обострение заболевания.

Нами был применен метод световой микроскопии окрашенных препаратов. Для определения некротизированных нейтрофилов использовали окраску трипановым синим, т.к. при некрозе нарушается структура клеточной оболочки и краситель свободно проникает в клетку. При определении апоптоза нейтрофилов мазки окрашивали по Романовскому – Гимза и исследовали в световом микроскопе. Данный метод обладает значительным преимуществом по сравнению с исследованием поверхностных маркеров апоптоза, поскольку последние выявляют только готовность клетки к апоптозу, но не его реализацию.

Таблица. Характеристика групп обследованных пациентов

Группы и количество больных	I (26)	II (32)	III (31)	IV (30)	V (28)
Этиологические факторы	Практически здоровые	Грамм-положительные бактерии	Грамм-положительные бактерии + <i>C. albicans</i>	Грамм-отрицательные бактерии	Грамм-отрицательные бактерии + <i>C. albicans</i>
Возраст (лет) M±m	61±5,4	66±5,2	67±6,2	64±4,9	68±6,3
Пол (м/ж)	12/14	18/14	17/14	18/12	16/12
ОФВ1/ФЖЕЛ >70%	26	–	–	–	–
ОФВ1 /ФЖЕЛ <70%	–	32	31	30	28
ОФВ1 > 80%	26	20	12	14	7
50% < ОФВ1 < 80%	–	12	19	16	21
Количество обострений в год (абс.)					
< 3	–	18	10	14	7
3 и более	–	14	21	16	21
Наличие хронических симптомов воспаления	–	8	11	7	15

Примечание: ОФВ – объем форсированного выдоха за 1–ю секунду (% от должного); ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistic 6. Проводили вычисление средних арифметических величин и средних квадратических отклонений. Для оценки статистической значимости различий между соответствующими показателями вычисляли критерий Стьюдента. Для определения связи между отдельными показателями использовали корреляционный анализ по Пирсону.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что при обострении ХОЗЛ в очаге инфекции значительно меняется физиологическое состояние нейтрофилов. Количество клеток, подвергшихся апоптозу, зависело от этиологического агента, индуцировавшего воспалительный процесс (рис. 1).

В группе здоровых доноров количество нейтрофилов в индуцированной мокроте, подвергшихся апоптозу, превышало число некротизированных клеток и составляло $14,1 \pm 1,72\%$ против $9,4 \pm 1,39\%$. Количество апоптотически измененных клеток среди больных существенно различалось. При бактериальной моноинфекции, вызванной грам-положительной микрофлорой (группа II), показатели апоптоза нейтрофилов у пациентов превышали значения контрольной группы и составляли $23,5 \pm 2,56\%$. Напротив, в IV группе пациентов этот показатель имел минимальное значение – $12,5 \pm 1,97\%$.

У всех больных ХОЗЛ установлено повышение количества некротизированных нейтрофилов в мокроте. У больных, у которых в этиологии обострения заболевания выявлены грам-отрицательные бактерии (группа IV), количество нейтрофилов, подвергшихся некрозу, оказалось выше, чем в группе II с инфекцией, обусловленной грам-положительными бактериями ($28,8 \pm 2,71\%$ против $14,8 \pm 2,94\%$).

При обострении ХОЗЛ смешанной кандидо-бактериальной этиологии наблюдалось повышение уровня как нейтрофилов, подвергшихся апоптозу, так и некротизированных клеток. Так, при микст-инфекции, обусловленной *Candida* в сочетании с грам-положительными бактериями, количество апоптотических нейтрофилов было выше ($29,8 \pm 2,12\%$), чем при соответствующей бактериальной моноинфекции ($23,5 \pm 2,56\%$).

У больных V группы показатель апоптоза нейтрофилов также превышал значения пациентов группы IV ($16,7 \pm 2,25\%$ против $12,5 \pm 1,97\%$).

Количество некротизированных нейтрофилов при смешанных инфекциях также было выше, чем при заболеваниях чисто бактериальной этиологии. Если в группе II (грам-положительная бактериальная моноинфекция) показатель некроза нейтрофилов составлял $14,8 \pm 2,94\%$, то у пациентов III группы (грам-положительные бактерии + *C. albicans*) его значения составляли $17,3 \pm 3,82\%$. Подобная же закономерность отмечалась и при сравнении данного показателя у больных IV и V групп, где он составил $28,8 \pm 2,71\%$ и $32,5 \pm 2,96\%$ соответственно.

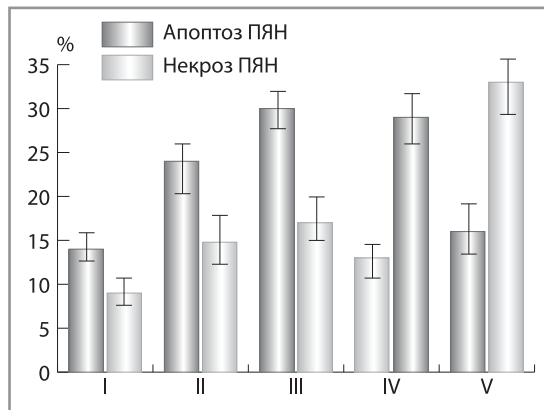


Рис. 1. Апоптоз и некроз нейтрофилов в индуцированной мокроте у больных ХОЗЛ

Примечание: ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы.

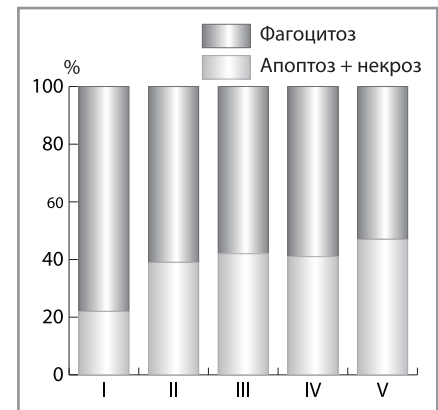


Рис. 2. Общее количество подвергшихся апоптозу и некротизированных нейтрофилов в индуцированной мокроте

Имея в виду, что как некротизированные, так и апоптотические нейтрофилы не могут полноценно выполнять свои антимикробные функции, мы сочли необходимым рассчитать суммарное процентное количество нейтрофилов, подвергшихся апоптозу и некрозу в каждой группе пациентов (рис. 2).

Как видно из приведенных данных, у больных с обострением ХОЗЛ микробной этиологии от $38,3 \pm 2,56\%$ до $49,2 \pm 2,53\%$ нейтрофилов были не способны полноценно выполнять свои антимикробные функции вследствие того, что находились в состоянии апоптоза или некроза. Особенно высокие значения суммарного показателя «апоптоз + некроз» определялись в группе со смешанной кандидо-бактериальной инфекцией ($46,1 \pm 2,64\%$ в группе III и $49,2 \pm 2,53\%$ у больных группы V). Это положение свидетельствует о более выраженном нарушении естественного иммунитета при кандидо-бактериальной природе обострения заболевания по сравнению с бактериальной моноинфекцией и в значительной степени объясняет факт более тяжелого и продолжительного течения смешанных инфекций по сравнению с бактериальными.

Следовательно, на уровень апоптоза существенное значение оказывал вид возбудителя. При инфекциях, обусловленных грам-положительными бактериями, количество апоптотически измененных клеток было выше, чем некротических. В случае инфекции, вызванной грам-отрицательными бактериями, некроз лейкоцитов превалировал над апоптозом. При кандидо-бактериальной инфекции отмечалось увеличение как апоптоза, так и некроза нейтрофилов по сравнению с соответствующими бактериальными моноинфекциями.

Выводы

В целом полученные нами данные свидетельствуют, что у больных с обострением ХОЗЛ, вызванным изученными грам-отрицательными возбудителями (*H. influenzae* и *E. coli*), отмечается гиперергическая реакция естественного иммунитета, в то время как на грам-положительные бактерии – менее значительная. Ассоциация с *C. albicans* вызывает дополнительные нарушения в системе естественного иммунитета.

Литература

1. Караев З.О., Лебедева Т.Н. Патогенез кандидоза и аллергии к грибам рода *Candida*. – Баку, 2007. – 215 с.
2. Киселева Р.Е., Федотова Г.Г. Апоптоз и его роль в ответе нейтрофилов // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 8. – С. 75–76.
3. Поталнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–243.
4. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких. – М.: Медицина, 2003. – 112 с.
5. Colotta F., Re F., Polentarutti N. et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products // Blood. – 1992. – №80. – P. 2012.
6. Heidenreich S., Otte B., Lang D. and Schmidt M. Infection by *Candida albicans* inhibits apoptosis of human monocytes and monocytic U937 cells // Journal of Leukocyte Biology. – Vol. 60, №6. – P. 737–743.
7. Kent A.R., William J.M. Lung Infections Role of Apoptosis in Host Defense and Pathogenesis of Disease // Chest. – 2000. – Vol. 117, № 6. – P. 1771–1777.
8. Liu J.J., Song C.W., Yue Y. et al. Quercetin inhibits LPS-induced delay in spontaneous apoptosis and activation of neutrophils // Inflamm. Res. – 2005. – Vol.54, №12. – P. 500–507.
9. Lundqvist-Gustafsson H., Norrman S., Nilsson J., Wilsson A. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland neutrophils *in vitro* // Vet. Med. – 2005. – Vol. 50, №1. – P. 11–23.
10. Makris D., Vrekoussis T., Izoldi M. et al. Increased apoptosis of neutrophils in induced sputum of COPD patient // Respir. Med. – 2009. – Vol.103, №8. – P. 1130–1135.
11. Nakayama Y., Endo M., Tsukano H. et al. Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway // J. Biochem. – 2010. – Vol. 147, №4. – P. 471–483.
12. Naylor E.J., Bakstad D., Biffen M. et al. *Haemophilus influenzae* induces neutrophil necrosis: a role in chronic obstructive pulmonary disease? // Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 135–143.