

УДК 616.24.-002-091.8]-053.4

## ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ.

Г.А. Павлишин, И.М. Сарапук

Государственное высшее учебное заведение «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского», Тернополь, Украина

*Целью данного исследования было изучить интенсивность процессов апоптоза и некроза нейтрофилов у детей раннего возраста при внебольничной пневмонии, выделить дополнительные критерии тяжести данного заболевания. Обследовано 73 ребенка первого года жизни с внебольничной пневмонией. Установлено, что у младенцев со средне-тяжелой пневмонией происходит активизация как апоптоза, так и умеренно выраженного некроза. С ростом тяжести заболевания отмечается усиление некротических процессов с тенденцией к подавлению апоптоза, что может служить дополнительным критерием тяжести внебольничной пневмонии у детей раннего возраста.*

**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, дети раннего возраста, апоптоз, некроз, нейтрофилы.

**Введение.** Бронхолегочная патология занимает ведущее место в структуре заболеваемости детского населения. Пневмония продолжает оставаться одним из распространенных заболеваний органов дыхания у детей раннего возраста [1, 3, 8]. Так, в Европе и Северной Америке заболеваемость пневмонией у детей до 5-летнего возраста составляет 34-40 случаев на 1000 детского населения, в Украине - от 4 до 20 случаев на 1000 детей в возрасте до 15 лет [1, 3, 14]. Высокие показатели распространенности и заболеваемости пневмонией, частое развитие осложнений и негативных последствий, угроза формирования хронических заболеваний легких обосновывают дальнейший поиск резервов усовершенствования диагностики и лечения данной патологии на основе глубокого изучения патогенетических особенностей.

Сегодня одной из актуальных задач прикладной науки является изучение процессов апоптоза - программированной клеточной гибели. Выяснение механизмов и роли апоптоза при определенных заболеваниях позволяет углубить патогенетические аспекты любой патологии, оптимизируя диагностические и лечебные подходы [2]. Особое значение играет апоптоз при воспалительных заболеваниях, обеспечивая адекватную элиминацию активированных клеток иммунной системы. Именно поэтому существенные изменения его интенсивности могут служить маркером иммунопатологического процесса [5]. Нарушение механизмов инициации и реализации программы гибели клеток часто доминирует в определении тяжести, характера течения заболеваний [2].

Несмотря на многочисленные достижения в изучении программированной клеточной гибели, остаются не до конца выясненными вопросы апоптотической активности в педиатрической практике, в частности, у детей раннего возраста с заболеваниями нижних дыхательных путей, ее зависимость от тяжести течения патологического процесса, диагностических и прогностических возможностей.

**Целью работы** было изучение интенсивности процессов апоптоза и некроза нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста при внебольничной пневмонии, их оценки для разработки дополнительных критериев тяжести данного заболевания.

**Материалы и методы.** Проведено обследование 73 детей первого года жизни, находящихся на стационарном лечении в Тернопольской областной детской клинической больнице с диагнозом внебольничной пневмонии. На момент госпитализации всем младенцам проведено комплексное клиническое и лабораторно-инструментальное исследование согласно протоколу (При-

каз Министерства здравоохранения Украины от 13.01.2005р. № 18 «Протокол лечения детей с пневмонией») [4]. По степени тяжести пневмонии все пациенты разделены на две группы. Критерием распределения служили выраженность клинических и лабораторно-функциональных проявлений заболевания, которые оценивали по индексу и шкале тяжести пневмонии [3]. Первую группу (I гр.) составили 44 ((60,3 ± 5,8%) ребенка со средне-тяжелой пневмонией, что соответствует I-II степени шкалы тяжести, вторую (II гр.) - 29 ((39,7 ± 5,8%) детей с тяжелым течением пневмонии, согласно III-IV степени. Группу контроля составили 23 практически здоровых ребенка того же возраста.

По возрасту дети распределялись следующим образом: до 1 месяца - 35 (47,9 ± 5,9%), от 1 месяца до 6 месяцев - 28 (38,4 ± 5,7%), от 6 месяцев до 1 года - 10 (13,7 ± 4,1%). Распределение по полу было примерно одинаковым: 40 мальчиков (54,8 ± 5,9%) и 33 девочки (45,2 ± 5,9%).

В периферической крови определяли содержание нейтрофилов, находящихся в состоянии апоптоза и некроза. Нейтрофильные гранулоциты выделяли на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколюрографина. В культурах нейтрофилов оценивали число клеток, находящихся в состоянии апоптоза и некроза, методом лазерной проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Epics XL («Beckman Coulter», США). Результат выражали в числе (%) клеток, вступивших в апоптоз и некроз [6].

Интенсивность апоптоза по активности каспазы-3 определяли спектрофотометрически по регистрации п-нитроанилина - продукта гидролиза ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нитроанилида каспазой-3 в нейтрофильных гранулоцитах крови [9].

Статистический анализ данных проводили с помощью статистических пакетов «EXCEL» и «STATISTICA 7.0.» Полученные данные обрабатывались с помощью непараметрических методов статистики путем вычисления медианы (Me) и интерквартильного размаха (Lq - нижний квартиль; Uq - верхний квартиль). Для сравнения двух выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (MW). Разницу параметров, что сравнивали по двум точкам, считали статистически значимой при  $p < 0,05$ . При сопоставлении показателей, которые характеризовались сравнением более 2 точек, использовали H-критерий дисперсионного анализа Краскела-Уоллеса, а различия считали достоверными с учетом поправки Бонферрони (при сравнении нескольких групп с общим контролем  $p' = p/m-1$ , где m - количество групп в эксперименте).

**Результаты и обсуждение.** В настоящее время активно обсуждается возможность использования оценки апоптоза и некроза клеток крови в качестве критериев тяжести воспалительного процесса [2, 5, 13]. Результаты исследований интенсивности процессов апоптоза и некроза нейтрофилов у детей раннего возраста с негоспитальной пневмонией приведены в таблице 1.

**Таблица 1-** Статистические характеристики интенсивности процессов апоптоза и некроза нейтрофилов у детей раннего возраста с внебольничной пневмонией

| Показатель                                      | Стат. показатель | Группы обследованных  |                                     |            |             |
|---|------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------|-------------|
|   |                  | Группа контроля, n=23 | Младенцы с внебольничной пневмонией |            |             |
|   |                  |                       | Все, n=73                           | I гр, n=44 | II гр, n=29 |
| Процент нейтрофилов в стадии апоптоза (% НА), % | Me               | 7,12                  | 15,36*                              | 17,87*     | 11,43***    |
|   | Lq               | 6,27                  | 12,43                               | 16,50      | 10,60       |
|   | Uq               | 8,53                  | 17,97                               | 18,86      | 13,61       |
| Процент нейтрофилов в стадии некроза, (% НН), % | Me               | 0,27                  | 1,17*                               | 0,96*      | 1,93***     |
|   | Lq               | 0,18                  | 0,88                                | 0,75       | 1,73        |
|   | Uq               | 0,32                  | 1,73                                | 1,12       | 2,75        |
| Активность каспазы-3 (АК-3), пмоль / мг белка)  | Me               | 3,47                  | 24,62*                              | 27,81*     | 17,15***    |
|   | Lq               | 3,05                  | 18,21                               | 24,99      | 15,86       |
|   | Uq               | 3,96                  | 28,15                               | 30,66      | 18,75       |

\* - достоверность разницы относительно группы контроля ( $p=0,0000$ );  
 \*\*\* - достоверность разницы между показателями I и II групп ( $p=0,0000$ ).

Оценка интенсивности процессов апоптоза у детей раннего возраста с внебольничной пневмонией свидетельствует о достоверной разнице с группой контроля, в два раза превышая содержание апоптических нейтрофилов ( $p=0,0000$ ). В зависимости от тяжести заболевания наблюдается разнонаправленный характер нарушений. В частности, у детей I группы интенсивность апоптоза нейтрофилов растет по сравнению со здоровыми ( $p_{к-1}=0,0000$ ), у пациентов II группы интенсивность апоптоза достоверно превышает группу контроля ( $p_{к-2}=0,0000$ ), однако отличается снижением активности процессов апоптоза от показателей детей I группы ( $p_{1-2}=0,0000$ ). Полученные результаты свидетельствуют о защитном характере повышенного уровня апоптоза нейтрофилов при средне-тяжелой пневмонии у детей раннего возраста, который направлен на элиминацию возбудителя, избытка активных нейтрофилов, способствуя завершению воспалительного процесса в тканях.

В случае тяжелого течения заболевания количество нейтрофилов, которые вступили в стадию апоптоза, снижается, что указывает на подавление их апоптической активности и может быть фактором, который поддерживает нейтрофильное воспаление. В то же время задержка реализации программируемой гибели нейтрофилов усиливает проницаемость воспалительных клеток и поддерживает патологический процесс [7].

Апоптическая гибель клеток связана с активацией каскада апоптозных протеаз, одной из которых является каспаза-3. Активность каспазы-3 повышается у детей с внебольничной пневмонией по сравнению с группой контроля ( $p=0,0000$ ), и, аналогично интенсивности апоптоза, отмечается тенденция к снижению ее активности с нарастанием тяжести заболевания (17,15 (15,86; 18,75) пмоль / мг белка - во II группе по сравнению с 27,81 (24,99; 30,66) пмоль / мг белка - в I группе),  $p_{1-2}=0,0000$ . Установлена положительная корреляционная связь между уровнем апоптически измененных нейтрофилов и активностью каспазы-3, что подтверждает роль каспаз в активации программируемой клеточной гибели ( $t=11,9994$ ,  $p=0,0000$ ).

Противоположным процессу апоптоза клеток является их гибель путем некроза. Некроз нейтрофилов возникает вследствие цитотоксичности чрезмерных вредных факторов или угнетения фагоцитоза апоптических нейтрофилов, что приводит к вторичному некрозу [11]. Уровень некроза нейтрофилов у детей с пневмонией коррелирует с тяжестью заболевания. Так, у детей с внебольничной пневмонией наблюдается как повышение числа апоптически, так и некротически измененных нейтрофилов, однако с ростом тяжести заболевания некроз данных иммунокомпетентных клеток устойчиво и достоверно возрастает ( $p_{к-1}=0,0000$ ,  $p_{к-2}=0,0000$ ). Это приводит к усилению воспалительных процессов и ухудшает течение заболевания, поскольку некроз сопровождается нарушением целостности мембраны и высвобождением гистотоксического содержания нейтрофилов во внеклеточное пространство. При этом отмечается у детей II группы обратная корреляционная связь между показателями апоптоза и некроза нейтрофилов ( $t=2,53533$ ,  $p=0,0173$ ).

Во время проведения дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса статистических характеристик показателей активности процессов апоптоза и некроза нейтрофилов установлено, что критерий Краскела-Уоллиса (H) по всем параметрам высоко значимый, а именно: % НА - H = 79,40,  $p=0,0000$ ; % НН - H = 80,52,  $p=0,0000$ ; АК-3 - H = 80,20,  $p=0,0000$ . Это дает право утверждать, что статистические характеристики соответствующих показателей в разных группах статистически значимо различаются между собой, а уровень активности исследованных параметров зависит от принадлежности пациентов к той или иной группе, что дает возможность оценивать степень тяжести пневмонии.

Усиление апоптоза нейтрофилов при средне-тяжелой пневмонии у детей раннего возраста, очевидно, является важным компенсаторным механизмом, направленным на разрешение воспалительного процесса. В то же время программируемая гибель клеток не приводит к интоксикации организма продуктами их распада. Установлено также, что нейтрофилы в состоянии апоптоза прекращают выработку и высвобождение провоспалительных медиаторов, что указывает на противовоспалительную роль процесса апоптоза [10, 12]. Полученные данные согласуются с результатами экспериментальных исследований. Так, при моделировании воспалительного процесса (артрита, пневмонии, плеврита) усиление апоптоза нейтрофилов свидетельствовало о положительной динамике в разрешении патологического процесса [11].

**Выводы.** У детей раннего возраста с внебольничной пневмонией наблюдается достоверное повышение интенсивности процессов апоптоза и некроза нейтрофилов. У младенцев со средне-тяжелой пневмонией происходит активизация элиминации нейтрофилов из организма как путем апоптоза, что является важным компенсаторным механизмом, направленным на разрешение воспалительного процесса, так и умеренно выраженного некроза. С ростом тяжести заболевания отмечается усиление некротических процессов с тенденцией к подавлению апоптоза.

Установлена связь интенсивности апоптоза и некроза нейтрофилов со степенью тяжести внебольничной пневмонии - тяжелое течение заболевания сопровождается снижением апоптической активности нейтрофилов и усилением их некротических процессов, что может слу-

жить дополнительным критерием тяжести внебольничной пневмонии у детей раннего возраста.

### Литература

1. Антипкін, Ю. Г. Принципи діагностики та лікування негоспітальних пневмоній у дітей / Ю. Г. Антипкін, В. Ф. Лапшин, Т. Р. Уманець // Здоров'я України. - 2008. - № 24/1. - С. 11-13.
2. Апоптоз нейтрофильных гранулоцитов у хворих на туберкулез легень / О. Р. Панасюкова, К. Ф. Чернушенко, Л. П. Кадан [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. - 2007. - № 3. - С. 48-51.
3. Майданник, В. Г. Внебольничная пневмония у детей: какой должна быть тактика педиатра? / В. Г. Майданник // Здоровья Украины. - 2009. - № 24 (1). - С. 19-20.
4. Наказ МОЗ України від 13.01.05 № 18 Про затвердження Протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «Дитяча пульмонологія».
5. Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний / Н. В. Рязанцева, Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая [и др.] // Бюллетень СО РАМН. - 2010. - Т. 30, - № 5. - С. 58-63.
6. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. Ramaekers [et al.] // Journal of Cytometry. - 1998. - Vol. 31, - N. 1.- P.-19.
7. Enhanced PMN response in chronic bronchitis and community-acquired pneumonia / A. Strassburg, D. Droemann, G. van Zandbergen, H. Kothe [et al.] // European Respiratory Journal. - 2004. - Vol. 24, N. 5. - P. 772-778.
8. Epidemiology of community-acquired pneumonia in children seen in hospital / J. E. Clark, D. Hammad, F. Hampton [et al.] // Epidemiology and Infection. - 2007. - Vol. 135, - N. 2, - P. 262-269.
9. Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia / M. Bonomini, S. Dottori, A. Amoroso [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. - 2004. - Vol. 2, - N. 8. - P.18.
10. Kebir, D.E. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation / D.E. Kebir, J.G. Filep // The ScientificWorld Journal. 2010. - Vol. 10. - P. 1731-1748.
11. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease / S. Fox, A. E. Leitch, R. Duffin [et al.] // Journal of Innate Immunity. - 2010. - Vol. 2, - N. 3.- P. 216-227.
12. Neutrophils: dead or effete? Cell surface phenotype and implications for phagocytic clearance / I. Dransfield, A.G. Rossi, S.B. Brown, S. P. Hart // Cell Death and Differentiation. - 2005. - Vol. 12, N. 11. - P. 1363-1367.
13. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation / J. M. Hallett, A. E. Leitch, N. A. Riley[et al.] // Trends in Pharmacological Sciences. - 2008. - Vol. 29,- N. 5. P. 250-257.
14. Woods, C. R. Acute bacterial pneumonia in childhood in the current era / C. R. Woods // Pediatric Annals. - 2008. - Vol. 37, -N. 10. P. 694-702.

## PROGRAMMED DEATH OF NEUTROPHILS IN INFANTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

*H. A. Pavlyshyn, I. M. Sarapuk*

State higher education institution "Ternopil State Medical University named after I.Ya Horbachevsky", Ternopil, Ukraine

*The aim of this study was to investigate the intensity of apoptosis and necrosis of neutrophils in infants with community-acquired pneumonia, to identify additional criteria of severity of the disease. There were examined 73 infants with community-acquired pneumonia. In infants with medium-severe pneumonia both apoptosis and moderately expressed necrosis are activated. With increasing severity of disease intensification of necrotic processes with a tendency toward inhibition of apoptosis is observed, which may serve as an additional criterion for severity community-acquired pneumonia in infants.*

**Key words:** *community-acquired pneumonia, infants, apoptosis, necrosis, neutrophils.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: galina\_pavlishin@mail.ru

Поступила 18.03.2013