

## АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С НЕОНАТАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ

Халит Саубанович Хаертынов\*, Сергей Васильевич Бойчук, Владимир Алексеевич Анохин, Павел Дмитриевич Дунаев, Булат Рашитович Рамазанов, Марат Альбертович Сатрутдинов, Евгения Александровна Агафонова

Казанский государственный медицинский университет

### Реферат

**Цель.** Оценка интенсивности апоптоза лимфоцитов крови у детей с неонатальным сепсисом.

**Методы.** Проведено определение апоптоза лимфоцитов у 20 детей с поздним неонатальным сепсисом, из которых 16 (80%) родились недоношенными. Бактериологическое исследование крови позволило выделить микроорганизмы у 9 (45%) детей: в 3 случаях высевался гемолитический стафилококк, в 4 – клебсиелла, в 2 – грибы рода *Candida*. Контрольную группу составили 10 здоровых детей периода новорожденности. Апоптоз лимфоцитов оценивали путём определения величины трансмембранного митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ). Проводили окрашивание лимфоцитов флуорохромом DiOC<sub>6</sub>. Оценку результатов проводили на проточном цитометре. О снижении величины митохондриального потенциала судили по снижению уровня флуоресценции флуорохрома DiOC<sub>6</sub>. Данный параметр служит одним из наиболее ранних признаков апоптоза.

**Результаты.** Было установлено усиление процессов апоптоза, что проявлялось увеличением количества клеток со сниженным мембранным потенциалом (DiOC-негативные клетки) у всех детей с неонатальным сепсисом. В 50% случаев сепсиса (10 детей) количество подвергшихся апоптозу лимфоцитов было выше показателей контроля в среднем 3,4 раза, в 25% (5 детей) – в 6 раз, ещё в 25% (5 детей) – в 13,4 раза. При этом абсолютная лимфопения отмечена только в 65% случаев. Наибольшее усиление апоптоза выявлено у пациентов с минимально выраженной острой воспалительной реакцией. Период реконвалесценции характеризовался снижением выраженности апоптоза лимфоцитов, что проявлялось уменьшением количества клеток со сниженным мембранным потенциалом в среднем в 1,9 раза. Уменьшение апоптоза лимфоцитов в периоде реконвалесценции протекало на фоне увеличения содержания в крови абсолютного количества лимфоцитов.

**Вывод.** Острый период неонатального сепсиса протекает на фоне усиления апоптоза лимфоцитов.

**Ключевые слова:** неонатальный сепсис, апоптоз лимфоцитов, иммунитет.

**LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN NEWBORNS WITH NEONATAL SEPSIS** *Kh.S. Khaertynov, S.V. Boychuk, V.A. Anokhin, P.D. Dunaev, B.R. Ramazanov, M.A. Satrutdinov, E.A. Agafonova. Kazan State Medical University, Kazan, Russia.*  
**Aim.** To assess the lymphocyte apoptosis intensity in children with neonatal sepsis. **Methods.** Lymphocyte apoptosis was assessed in 20 children [of them 16 (80%) prematurely born] with late neonatal sepsis. Bacteriology tests allowed to identify the causative agent for sepsis in 9 (45%) cases – *Staphylococcus haemolyticus* in 3 cases, *Klebsiella* – in 4 cases, *Candida* – in 2 cases. The control group consisted of 10 healthy newborns. Lymphocyte apoptosis was assessed by determining the amount of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Lymphocytes were stained with fluorochrome DiOC<sub>6</sub>. Results were obtained by flow cytometry. A decrease in mitochondrial potential value was defined as the reduction of fluorochrome DiOC<sub>6</sub> fluorescence. This parameter is one of the earliest signs of apoptosis. **Results.** An increased apoptosis was revealed, which was manifested by an increase in the number of cells with reduced membrane potential (DiOC-negative cells) in all children with neonatal sepsis. In 50% of sepsis cases (10 newborns) the number of lymphocytes in which apoptosis was triggered was higher by 3.4 times compared to control, in 25% of cases (5 newborns) – by 6 times, in another 25% (5 newborns) – by 13.4 times. Meanwhile, an absolute lymphopenia was observed only in 65% of cases. The most extensive apoptosis was observed in patients with minimal intensity of severe acute inflammatory reaction. Recovery period was characterized by a decrease in apoptosis intensity, seen as the reduction of the number of cells with reduced membrane potential by mean of 1.9 times. Reduced intensity of lymphocyte apoptosis at recovery was associated with lymphocyte count increase in peripheral blood. **Conclusion.** Acute phase of neonatal sepsis occurs on the background of the increased intensity of lymphocyte apoptosis. **Keywords:** neonatal sepsis, lymphocyte apoptosis, immunity.

Одно из важнейших звеньев патофизиологии сепсиса – дисфункция иммунной системы. Положение это особенно актуально для периода новорожденности, характеризующегося незрелостью трансплацентарно-гуморального и других факторов врождённого иммунитета на фоне слабости адаптивных иммунных реакций. Этими особенностями в первую очередь объясняется и факт высокой частоты генерализованных бактериальных инфекций в первые дни жизни человека [3].

В качестве основной патофизиологической причины развития септического процесса в по-

следние годы рассматривают дисбаланс в системе про- и противовоспалительных медиаторов [14]. При этом выделяют два возможных «сценария» развития событий. Первый протекает на фоне гиперпродукции провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли альфа, интерлейкинов-1 и -6), приводящей к развитию синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности, тогда как второй, развивающийся на фоне преимущественно синтеза противовоспалительных медиаторов (интерлейкинов-4 и -10), – к развитию апоптоза и анергии клеток иммунной системы [1, 14].

Апоптоз, как известно, – программируемая

Адрес для переписки: khalit65@rambler.ru

гибель клеток, представляющая собой одну из форм физиологических реакций организма, направленных на элиминацию генетически чужеродных клеток и поддержание гомеостаза [4]. Важная особенность апоптоза, принципиально отличающая его от некроза, — отсутствие воспалительной реакции соседних клеток на продукты распада, сохранение целостности мембраны и ультраструктур элиминируемых клеток [4, 11]. К характерным морфологическим признакам апоптоза относят дегидратационное сжатие клеток, утрату межклеточных контактов, так называемый блеббинг (формирование пузыреподобных выпячиваний), разрушение цитоскелета, конденсацию хроматина, фрагментацию ядер и деградацию дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [8].

Индукция апоптоза может проходить двумя основными путями: либо путём активации Fas-рецепторов («рецепторы смерти») плазматической мембраны (внешний путь), либо путём снижения мембранного потенциала митохондрий (внутренний путь) [11]. Лабораторными маркерами апоптоза иммунокомпетентных клеток служат экспрессированные на плазматических мембранах белки CD95 (Fas-рецептор) и CD120 (рецептор фактора некроза опухоли), снижение мембранного потенциала митохондрий и высвобождение цитохрома С, транслокация фосфатидилсерина с внутренней на наружную поверхность мембраны клеток, повышение активности каспаз [2, 11]. Нарушение апоптоза лежит в основе развития различных заболеваний (онкологических, аутоиммунных), в том числе и инфекционных — как вирусных (инфицирование вирусом иммунодефицита человека), так и бактериальных (сепсис) [11, 13]. При этом направленность процессов апоптоза может быть различной (индукция или ингибирование).

Острый период бактериальной инфекции (в том числе при сепсисе), как правило, сопровождается ингибированием апоптоза нейтрофилов [2, 13]. Очевидно, что связано это с повышенным образованием в острой фазе заболевания и действием провоспалительных цитокинов, являющихся естественными ингибиторами апоптоза [2]. Усиление апоптоза при сепсисе происходит в случаях преобладания синтеза противовоспалительных цитокинов (индукторов апоптоза), что отмечают при развитии наиболее тяжёлых форм этого заболевания — тяжёлого сепсиса и септического шока [5].

Патологоанатомические исследования людей, которые умерли от сепсиса, указывают на наличие выраженного апоптоза различных иммунокомпетентных клеток — В-лимфоцитов и CD4-лимфоцитов [9, 10]. Апоптоз лимфоцитов при сепсисе приводит к снижению эффективности иммунного ответа и ухудшению клиренса вторгшихся в организм микроорганизмов [12]. При этом выраженность апоптоза лимфоцитов прямо коррелирует с тяжестью септического процесса и степенью иммуносупрессии [5].

Апоптоз клеток иммунной системы может иметь решающее значение в разрешении процессов воспаления [2, 15]. Кроме клеток иммунной системы, апоптоз при сепсисе формируется в клетках паренхиматозных органов, эндотелии сосудов и представляет собой важный механизм развития тканевых повреждений и органной дисфункции у пациентов с сепсисом [4]. Было показано, что подавление процессов апоптоза при сепсисе снижает риск развития органной дисфункции и летального исхода [7]. В свете этого оценка активности процессов апоптоза клеток иммунной системы может быть использована в качестве возможного индикатора прогноза заболевания.

Цель исследования — оценка интенсивности апоптоза лимфоцитов крови у детей с неонатальным сепсисом.

Обследованы 20 детей с поздним неонатальным сепсисом, находившихся на стационарном лечении в отделениях реанимации новорождённых детской республиканской больницы и детской больницы №1 г. Казани. 16 (80%) детей родились недоношенными на следующих сроках: 28–30 нед гестации — 6 детей, 30–32 нед — 4 детей, 32–36 нед — 6 детей, 37–38 нед — 4 детей.

Диагноз «сепсис» был основан на наличии синдрома системного воспалительного ответа с повышением концентрации в крови С-реактивного белка более 1,5 мг/дл и наличием одного или нескольких очагов инфекции, а также выделении микроорганизма из венозной крови.

Практически у всех детей была диагностирована пневмония на фоне ателектазов с признаками дыхательной недостаточности. У 2 недоношенных в дальнейшем сформировалась бронхолёгочная дисплазия. У 5 (25%) детей отмечалось поражение пищеварительного тракта в виде энтероколита (4 случая), гангренозно-перфоративного аппендицита, осложнившегося перитонитом (1 случай). В 5 (25%) случаях диагностирован реактивный гепатит, у 4 детей — кардиопатия. В 6 (30%) случаях выявлены проявления синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (петехиальная сыпь, отхождение по желудочному зонду содержимого по типу «кофейной гущи», в общем анализе крови — тромбоцитопения, снижение протромбинового индекса, увеличение времени свёртывания крови). У 4 детей отмечались циркуляторные нарушения в виде мраморности кожных покровов. В 5 случаях зарегистрированы проявления полиорганной недостаточности. Бактериологическое исследование крови позволило выделить микроорганизмы у 9 (45%) детей: в 3 случаях высевался гемолитический стафилококк, в 4 — клебсиелла, в 2 — грибы рода *Candida*. Контрольную группу составили 10 здоровых детей периода новорождённости.

Апоптоз лимфоцитов оценивали путём определения величины трансмембранного митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ). Лимфоциты

периферической крови выделяли центрифугированием на градиенте плотности раствора «Фиколл-Пак» («Sigma», США).

Проводили окрашивание лимфоцитов флюорохромом DiOC<sub>6</sub>. Оценку результатов проводили на проточном цитометре «Facs Calibur» в программе «CellQuest». О снижении величины митохондриального потенциала судили по снижению уровня флюоресценции флюорохрома DiOC<sub>6</sub>. Данный параметр служит одним из наиболее ранних признаков апоптоза [6]. Кроме того, оценивали содержание в периферической крови количества лейкоцитов и лимфоцитов. Анализ результатов проводили в динамике обследования — в остром периоде и в периоде реконвалесценции.

Было установлено, что острый период неонатального сепсиса протекает на фоне усиления активности процессов апоптоза лимфоцитов по сравнению с контрольной группой, что проявлялось увеличением количества клеток со сниженным мембранным потенциалом (DiOC<sub>6</sub>-негативные клетки) у всех пациентов (табл. 1).

Таблица 1

**Количество лимфоцитов периферической крови (%) с низким митохондриальным потенциалом у детей в остром периоде неонатального сепсиса**

Контрольная группа (n=10)		Дети с сепсисом (n=20)			
N		N		N	
1	6,7	1	18,7	11	28
2	10,2	2	24,8	12	32,6
3	4,4	3	19,8	13	37,1
4	7,8	4	21,7	14	38,8
5	3,5	5	18,3	15	59,9
6	3,6	6	18,4	16	85
7	10,9	7	25	17	92,8
8	6,9	8	20,7	18	81,7
9	5,1	9	25,5	19	91,5
10	5,4	10	26	20	80,5

У 10 (50%) детей количество подвергшихся апоптозу лимфоцитов было выше показателей контроля в среднем 3,4 раза, у 5 детей — в 6 раз, ещё у 5 детей — в 13,4 раза. Изучение показателей периферической крови выявило состояние лейкопении (менее  $5 \times 10^9/\text{л}$ ) в 50% случаев, в 25% случаев количество лейкоцитов оставалось в пределах нормы и только у каждого четвертого больного (5 детей) установлен лейкоцитоз (более  $25 \times 10^9/\text{л}$ ). При этом в 85% случаев (17 детей) в лейкоцитарной формуле регистрировалась относительная лимфопения (менее 40% общего количества лейкоцитов), в 65% (13 детей) — абсолютная лимфопения (менее  $2,5 \times 10^9/\text{л}$ ).

Сравнительное изучение выраженности апоптоза лимфоцитов крови и синдрома системного воспалительного ответа (по концентрации С-реактивного белка) достоверной корреляции не выявило. Повидимому, это связано с существенными колебаниями выраженности апоптоза

лимфоцитов у обследованных детей. Кроме того, использованный нами метод оценки апоптоза не позволяет делать однозначные выводы о необратимости этого процесса.

В то же время заслуживает внимания тот факт, что среди небольшой подгруппы пациентов (5 детей), у которых зафиксировано максимальное увеличение числа апоптотически изменённых лимфоцитов, отмечены самые низкие показатели С-реактивного белка (не выше 2 мг/дл) в сравнении с остальными пациентами. Таким образом, у детей с неонатальным сепсисом наибольшая интенсивность апоптоза лимфоцитов обнаружена на фоне минимальной выраженности острой воспалительной реакции и признаков полиорганной недостаточности.

Период реконвалесценции характеризовался снижением выраженности апоптоза лимфоцитов, что проявлялось уменьшением количества клеток со сниженным мембранным потенциалом в среднем в 1,9 раза. Только у 1 больного на протяжении всего заболевания количество апоптотических лимфоцитов оставалось повышенным. Уменьшение апоптоза лимфоцитов в периоде реконвалесценции протекало на фоне увеличения содержания в крови абсолютного количества лимфоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. Острый период неонатального сепсиса протекает на фоне усиления апоптоза лимфоцитов, при этом развитие абсолютной лимфопении происходит только в 65% случаев. В свете этого при неонатальном сепсисе представляется целесообразным выполнение не только рутинных анализов крови, но и специальных анализов, направленных на выявление маркёров апоптоза.

2. Используемый в нашем исследовании метод измерения мембранного потенциала клеток позволяет регистрировать апоптоз на его ранних стадиях. Однако на основании измерения только трансмембранного митохондриального потенциала невозможно однозначно судить о необратимости апоптоза. Для полноты оценки апоптоза необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на выявление фрагментации ядра и дезоксирибонуклеиновой кислоты клетки.

3. Сам факт выявления апоптоза иммунокомпетентных клеток при сепсисе и других тяжёлых бактериальных инфекциях имеет важное диагностическое, прогностическое значение и является основанием для своевременного назначения соответствующей иммунокорректирующей терапии в виде использования стимуляторов лимфоцитов или нейтрофилов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородов В.Б. Иммунопатология тяжёлого сепсиса и возможности её коррекции // Вестн. интенсивн. терап. — 2010. — №4. — С. 3-8.
2. Винокуров М.Г., Юринская М.М. Регуляция апо-

птоза нейтрофилов при действии липополисахаридов // Биол. мембраны. — 2010. — Т. 27, №1. — С. 18–27.

3. Самсыгина Г.А. О предрасполагающих факторах и факторах риска развития неонатального сепсиса и о современных подходах его лечения // Педиатрия. — 2012. — Т. 91, №3. — С. 32–37.

4. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение водного и ионного баланса клетки // Цитология. — 2007. — Т. 49, №5. — С. 385–394.

5. Bochud P.Y., Calandra Th. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implication for future treatment // BMJ. — 2003. — Vol. 326, N 738. — P. 262–265.

6. Castedo M., Hirsch T., Susi S.A. et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis // J. Immunol. — 1996. — Vol. 157, N 2. — P. 512–521.

7. Coopersmith C.M., Stromberg P.E., Dunne W.M. et al. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis // JAMA. — 2002. — Vol. 287. — P. 1716.

8. Hacker G. The morphology of apoptosis // Cell Tissue Res. — 2000. — Vol. 301. — P. 5–17.

9. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D. et al. Apop-

totic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction // Crit. Care Med. — 1999. — Vol. 27. — P. 1230–1251.

10. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E. et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in humans // J. Immunol. — 2001. — Vol. 166. — P. 6952–6963.

11. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // Toxicol. Pathol. — 2007. — Vol. 35, issue 4. — P. 495–516.

12. Kasten K.R., Tschup J., Adediran S.G. et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis // Shock. — 2010. — Vol. 34, N 4. — P. 327–336.

13. Milot E., Fotouhi-Ardakani N., Filep J.G. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis // Front Immunol. — 2012. — Vol. 3. — P. 397.

14. Richard S.H., Irene E.K. The pathophysiology and treatment of sepsis // New Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 348, N 2. — P. 138–150.

15. Sarah F., Leitch A.E., Duffin R. et al. Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease // J. Innate Immun. — 2010. — Vol. 2, N 3. — P. 216–227.

УДК 577.121.7: 578.891: 578.828.6: 616.89-008.441.13-008.1: 616.36-002: 616.153.1

НО34

## ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛЬНЫМ ДЕЛИРИЕМ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА С И ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Вадим Эдуардович Цейликман<sup>1\*</sup>, Константин Александрович Бабин<sup>2</sup>,  
Дмитрий Борисович Виноградов<sup>2</sup>, Юлия Михайловна Шатрова<sup>1</sup>, Борис Васильевич Изаровский<sup>2</sup>,  
Евгения Борисовна Манухина<sup>4</sup>, Гарри Фред Дауни<sup>4</sup>, Ольга Борисовна Цейликман<sup>3</sup>,  
Андрей Ханифович Мингазов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск,

<sup>2</sup>Челябинская областная клиническая наркологическая больница,

<sup>3</sup>Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск,

<sup>4</sup>Центр медицинских наук Университета Северного Техаса (Форт Уэрт)

### Реферат

**Цель.** Определить вклад влияния коморбидной вирусной инфекции на особенности окислительного стресса при алкогольном делирии.

**Методы.** Обследование было выполнено на 110 мужчинах трудоспособного возраста (23–55 лет) с диагнозом «алкогольный делирий», из них 28 пациентов — с вирусным гепатитом С, 18 пациентов — с коморбидным инфицированием вирусом иммунодефицита человека, 44 больных — с алкогольным делирием без коморбидных вирусных инфекций. У 20 больных алкогольным делирием одновременно обнаружены вирусы гепатита С и иммунодефицита человека. В крови определяли содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов и карбонилированных белков.

**Результаты.** Во всех исследуемых группах выявлены признаки цитолитического синдрома в виде повышенной активности аминотрансфераз и окислительного стресса, проявляющегося в повышении содержания карбонилированных белков относительно контроля. Однако исследованные группы варьировали по выраженности как цитолитического синдрома, так и окислительного стресса. Наиболее отчетливое увеличение активности аминотрансфераз и повышение уровня карбонилированных белков характерно для групп пациентов, инфицированных вирусом гепатита С и вирусом иммунодефицита человека, но не страдающих алкогольной зависимостью. В этих группах также снижалось содержание в крови продуктов перекисного окисления липидов. В условиях алкогольного делирия, а также при инфицировании пациентов, страдающих алкоголизмом, вирусом гепатита С и вирусом иммунодефицита человека, как и у больных без алкогольной зависимости, но инфицированных этими вирусами, окислительный стресс проявляется исключительно в усилении карбонилирования белков.

**Вывод.** Коморбидная вирусная инфекция влияет на масштабы окислительного стресса и дисфункции печени у больных алкогольным делирием.

**Ключевые слова:** алкогольный делирий, вирусный гепатит С, вирус иммунодефицита человека, перекисное окисление липидов, карбонилирование белков.