

## КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ МЕСТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

© Н. М. Кондрашова,<sup>1</sup> Н. Г. Плехова,<sup>2, \*</sup> Д. В. Заворуева,<sup>1</sup> Л. М. Сомова,<sup>2</sup>  
Б. И. Гельцер,<sup>1</sup> А. В. Костюшко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Владивостокский государственный медицинский университет

и <sup>2</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток;

\* электронный адрес: pl\_nat@hotmail.com

Внебольничная пневмония (ВП) относится к наиболее частым заболеваниям у человека и является одной из ведущих причин смерти от инфекционных болезней. К основным компонентам, характеризующим процесс воспаления в легких при ВП, принадлежат повышение сосудистой проницаемости и миграция нейтрофилов и моноцитов (макрофагов) в место внедрения инфекционных агентов, а реактивность этих клеток определяет исход заболевания. В настоящей работе установлено, что у больных в зависимости от тяжести течения ВП значительно увеличивалось количество нейтрофилов и повышалось число гибнущих фагоцитирующих клеток. При этом содержание некротизированных нейтрофилов и макрофагов в очаге воспаления зависит от тяжести течения ВП, тогда как различие между показателями апоптоза у этих больных недостоверно, и гибель клеток путем апоптоза преимущественно выявляется в популяции макрофагов. Анализы фагоцитарной и ферментативной активности клеток местной защиты больных ВП показали, что состояние неспецифической резистентности их организма в значительной степени определяет тяжесть течения заболевания и что лечение антибиотиками не оказывает влияния на нормализацию функций нейтрофилов и макрофагов.

**Ключевые слова:** апоптоз, ферменты, нейтрофилы, макрофаги (моноциты), внебольничная пневмония.

**Принятые сокращения:** ВП — внебольничная пневмония, ИА — индекс апоптоза, ИМ — индуцированная мокрота, ИН — индекс некроза, КБ — катионные белки, КФ — кислая фосфатаза, МПО — миелопероксидаза, ФП — фагоцитарный показатель (доля клеток, поглотивших бактерии), ФЧ — фагоцитарное число (среднее количество бактерий, поглощенных одним фагоцитом), НСТ-тест — тест с нитросиним тетразолием.

В последнее десятилетие пневмонии различают в зависимости от условий возникновения: внебольничные — когда заболевание развивается у человека вне пределов стационара, и внутрибольничные — госпитальные, нозокомиальные (Чучалин и др., 2005). В развитых странах летальность от внебольничной пневмонии (ВП) занимает 6-е место среди других причин смертности и 1-е — среди инфекционных заболеваний (Niederman et al., 2001; Bonnard et al., 2005).

По данным клинического анализа крови, при этом заболевании лейкоцитоз более  $12 \cdot 10^9$  кл./л указывает на высокую вероятность бактериальной инфекции, а лейкопения ниже  $3 \cdot 10^9$  кл./л или лейкоцитоз выше  $25 \cdot 10^9$  кл./л являются неблагоприятными прогностическими признаками (Березняков, Губина, 2000). У больных ВП также отмечаются выраженные нарушения факторов неспецифической резистентности организма, клеточного и гуморального звеньев иммунитета (Земсков и др., 2000; Голофеевский, Лисовский, 2004). Однако исследования иммунного статуса больных ВП не позволяют судить о состоянии местного иммунитета в легочной ткани, что связано с необходимостью применения сложных инвазивных процедур получения материала для исследования, на-

пример бронхоскопии с забором бронхоальвеолярного лаважа. В настоящее время существует альтернативный доступный неинвазивный метод получения индуцированной мокроты, который позволяет оценить интенсивность воспаления в дыхательных путях пациентов (Авдеев, Чучалин, 2001).

К основным компонентам, характеризующим процесс воспаления в легких при ВП, относятся изменение кровотока в микроциркуляторном русле, повышение сосудистой проницаемости, миграция нейтрофилов и моноцитов (макрофагов) в место внедрения инфекционных агентов, направленная на восстановление клеточного гомеостаза. При этом продолжительность рекрутирования нейтрофилов и моноцитов из кровеносного русла и реактивность этих клеток определяет инициацию, развитие и исход воспалительного процесса. На начальном этапе развития воспаления эффекторная роль нейтрофилов определяется их высоким флогогенным потенциалом, выражающимся в гиперпродукции и гиперсекреции ферментов и биологически активных веществ, тогда как моноциты (макрофаги) не обладают подобной мощной мгновенной реакционностью. Тем не менее эти клетки способны модулировать свойства нейтрофилов (Haslett, 1997).

Несмотря на многочисленные исследования неспецифических факторов резистентности при ВП, имеющиеся данные часто противоречивы. В доступной нам литературе не было обнаружено детального исследования клеточных элементов неспецифической защиты организма нейтрофилов и моноцитов (макрофагов) в индуцированной мокроте — месте воспаления у больных ВП — в зависимости от степени тяжести заболевания. При изучении фагоцитоза при пневмониях преимущественно исследовали поглотительную активность либо нейтрофилов, либо моноцитов, и данные свидетельствуют как о высоких, так и о низких показателях у взрослых и детей при ВП (Хаитов, Земсков, 1995; Bonnard et al., 2005). Как показано многочисленными исследователями, реактивность клеток не ограничивается одним фагоцитозом, а включает в себя и такие реакции, как хемотаксис, адгезия, киллинг на фоне «дыхательного взрыва» и внутриклеточное переваривание бактерий, а также секреторную дегрануляцию нейтрофилов (Alexis et al., 2000). Таким образом, нарушения в фагоцитарном звене иммунитета могут быть выявлены только при проведении комплексного исследования различных проявлений реактивности клеток.

Как известно, существуют две формы гибели клеток — некроз и апоптоз. Некроз — это патологическая форма клеточной смерти, вызванная воздействием вредных факторов, приводящих к нарушению целостности клеточной мембраны, в результате чего клетка лизируется и ее содержимое изливается в межклеточное пространство, что обычно приводит к развитию воспаления (Новиков, 1996). Апоптоз — особая форма программируемой клеточной смерти, сопровождаемая набором характерных молекулярных признаков (маркеров апоптоза) и процессов (Simon, 2003). Согласно экспериментальным данным последних лет, нарушение регуляции апоптоза лейкоцитарных клеток может играть ведущую роль в развитии воспаления дыхательных путей (Platakí et al., 2006), а процесс миграции лейкоцитов к месту воспаления сопровождается увеличением реактивности клеток и значительным повышением спонтанного апоптоза (Watson et al., 1997). Причем в месте воспаления апоптоз лейкоцитов может инициироваться различными медиаторами и механизмами, включая липополисахариды бактерий, цитокины и др. (Liles et al., 1996).

Цель нашего исследования — охарактеризовать функциональное состояние клеточных факторов врожденного иммунитета у больных ВП — нейтрофилов и моноцитов (макрофагов), а также оценить роль некроза и апоптоза этих клеток в развитии воспаления.

## Материал и методика

Проводили динамическое клиничко-лабораторное исследование 155 больных ВП, находившихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях больницы г. Владивостока, все пациенты были лицами мужского пола в возрасте 18—21 года, тяжесть течения ВП оценивали на основании выраженности клинических проявлений по критериям Дворецкого (Чучалин и др., 2005). В качестве материала исследования использовали индуцированную мокроту (ИМ) больных ВП в день поступления до начала применения антибиотиков и на 10-е сут терапии.

Индуцированную мокроту (ИМ) получали после ингаляций 3—5%-ного стерильного гипертонического солевого раствора; для ее индукции применяли компресси-

онный небулайзер «Omron» (Япония). Исследование мокроты проводили не позднее чем через 2 ч после получения материала; на протяжении всего этого времени образцы хранили при 4 °С. Для диспергирования и гомогенизации мокроты использовали 0.1%-ный раствор дитиотреитола (Serva, США), разрушающего дисульфидные связи гликопротеинов. Жизнеспособность клеток оценивали по окраске трипановым синим, концентрацию клеток доводили до 2 млн/мл.

Фагоцитарную активность клеток определяли, используя в качестве тест-бактерий культуры *Staphylococcus aureus* в соотношении 10 бактерий на 1 фагоцит. Через 30 и 120 мин контакта фагоцитов с бактериями пробы фиксировали 70%-ным этиловым спиртом в течение 15 мин для определения завершенности фагоцитоза. Препараты окрашивали по методике Нохт-Максимова. Определяли фагоцитарный показатель (ФП) — долю клеток (%), фагоцитировавших бактерии, и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество бактерий, поглощенных одним фагоцитом, и показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ), расчет которого проводили по формуле:  $ПЗФ = ФЧ1/ФЧ2$ , где ФЧ1 и ФЧ2 — фагоцитарное число через 30 и 120 мин инкубации.

НСТ — тест. К адгезированным клеткам добавляли по 100 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, содержащего нитросиний тетразол (НСТ; 1 мг/мл; ICN, США) В контрольные лунки вносили по 20 мкл среды 199, а в опытные — по 20 мкл суспензии бактерий из расчета 10 бактерий на 1 фагоцит. После инкубации при 37 °С в течение 40 мин клеточный монослой с образовавшимися зернами диформаза трижды отмывали от раствора НСТ и непоглощенных бактерий и высушивали. Клетки разрушали путем добавления в лунки по 50 мкл предварительно разогретого до 83 °С диметилсульфида (ДМСО; ICN, США). Оптическую плотность полученных субстратов измеряли на спектрофотометре Multiscan Titertek Plus (Flow Laboratories Inc., McLean, Virginia, США) при длине волны 540 нм. Калибрование проводили по раствору: 100 мкл реактива с добавлением 100 мкл среды 199. Средние показатели как спонтанного (контроль), так и индуцированного (опыт) НСТ-тестов определяли в триплетах. Определение активности остальных ферментов проводили в планшетах с монослоем клеток, предварительно фиксированным в парах формалина в течение 15 мин (Плехова и др., 2007).

Активность 5'-нуклеотидазы. К монослою клеток добавляли по 20 мкл субстрата для 5'-нуклеотидазы, включавшего в себя 4 мг аденозин монофосфата (Sigma, США) на 1 мл Трис-НСl-буфера, рН 7.8, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl<sub>2</sub>. Образцы оставляли при 37 °С на 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1 : 1. Через 20 мин результаты учитывали на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Для выявления кислой фосфатазы (КФ) к фиксированному монослою клеток добавляли 50 мкл раствора паранитрофенилфосфата (ПНФФ; ICN, США). Для его приготовления 0.09 г ПНФФ и 0.31 г NaCl растворяли в 37 мл 0.02 М натрий-цитратного буфера (рН 5.0). Реакцию проводили при 37 °С в течение 30 мин и останавливали добавлением 0.2 М раствора NaOH по 100 мкл на лунку. Результат учитывали с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм.

Для определения активности миелопероксидазы (МПО) к фиксированным клеткам вносили по

100 мкл ортофенилдиамин (ОФД; ICN, США), 4 мг/10 мл, на основе фосфатно-цитратного буфера (рН 5.0) с добавлением 500 мкл 0.33%-ной перекиси водорода. Монослой клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем реакцию останавливали добавлением 10%-ного раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 492 нм. В качестве контроля использовали образцы с растворами ОФД и 10%-ной серной кислоты.

Внутриклеточное содержание катионных белков (КБ) выявляли путем добавления к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного (1 мг/мл; Sigma, США) на основе Трис-метанолового буфера (рН 8.2), выдерживали в течение 30 мин, затем раствором Хенкса дважды отмывали невключившийся краситель, а связанный с КБ краситель растворяли ДМСО (50 мкл, ICN), предварительно разогретым до 80 °С. Оптическую плотность субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Определение содержания метаболитов оксида азота (NO) — нитритов (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). После инкубации при 37 °С надосадок и монослой клеток замораживали и хранили при -20 °С. К разрушенным макрофагам добавляли по 100 мкл реактива Griess, который состоял из равных объемов 0.1%-ного N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида и 1%-ного р-аминобензен-сульфамида (ICN, США) на основе 2.5%-ного раствора фосфорной кислоты. Через 10 мин контакта определяли оптическую плотность полученных субстратов на спектрофотометре при 540 нм. В качестве контроля использовали образцы с раствором субстрата без клеток.

Результаты спектрофотометрического анализа активности ферментов в фагоцитах выражали в виде унифицированного показателя T, который вычисляли по формуле

$$T = \frac{N_0 - N_k}{N_k} \cdot 100 (\%),$$

где  $N_0$  — средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата клеток больных,  $N_k$  — средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата клеток доноров.

Для выявления апоптотически измененных клеток применяли метод окрашивания клеточного осадка красителем Hoechst 33342 (Sigma, США). Для этого клеточный осадок путем центрифугирования промывали дважды в фосфатном буфере, содержащем 2% эмбриональной телячьей сыворотки, после чего в соотношении 1 : 1 вносили раствор Hoechst (1 мг/мл) на основе фосфатного буфера, рН 7.2. Клеточную суспензию инкубировали в течение 15 мин при 37 °С и клетки суспендировали в 50 мкл 50%-ного раствора глицерина. Препараты исследовали под люминесцентным микроскопом, с помощью фазового контраста подсчитывали 100 клеток и из них по наличию специфического свечения определяли долю апоптотически измененных клеток и выражали в виде индекса апоптоза (ИА).

Для выявления некротически поврежденных клеток в месте воспаления (ИМ больных ВП) мы использовали краситель акридиновый оранжевый (Serva, США). При нарушении проницаемости плазмалеммы клетки приобретают способность к свечению под люминесцентным микроскопом в красно-оранжевом спектре, тогда как жив-

неспособные клетки приобретают зеленое свечение. Для этого клеточный осадок путем центрифугирования дважды промывали в фосфатном буфере, содержащем 2% эмбриональной телячьей сыворотки. Затем в соотношении 1 : 2 вносили 0.1%-ный раствор Тритона X-100, 0.08 N HCl, 0.15 M NaCl на основе дистиллированной воды, с экспозицией 15 с. После этого в соотношении 1 : 2 вносили холодный раствор акридинового оранжевого (5 мг/мл) на основе цитратного буфера, рН 6.0, включающего в себя 1 mM EDTA-Na, 0.15 M NaCl, 0.2 M NaPO<sub>4</sub>. Препараты анализировали через 15 мин под люминесцентным микроскопом и на 100 клеток определяли долю поврежденных (%), которую выражали в виде индекса некроза (ИН).

## Результаты

В период разгара заболевания у больных ВП в ИМ регистрировали значительный рост количества клеточных элементов, превышающий уровень контрольной группы в 2.4 раза при легком течении ВП, в 4.5 раза при среднетяжелой и более чем в 5 раз — при тяжелой пневмонии. С увеличением тяжести течения заболевания снижались показатели жизнеспособности клеток, достигая  $74.2 \pm \pm 2.5 \%$ , при показателях контрольной группы  $98.1 \pm \pm 0.8 \%$  ( $P < 0.001$ ) (табл. 1). При цитологическом исследовании ИМ больных ВП по сравнению с контрольной группой выявлено повышение количества нейтрофилов и лимфоцитов. Так, при легком течении ВП содержание нейтрофилов относительно количества клеток в ИМ здоровых лиц увеличивалось в 1.8 раза, при среднетяжелом и тяжелом течении ВП — в 2.15 и 2.46 раза, а лимфоцитов — в 1.6, 2.3 и 1.7 соответственно (табл. 1). Нарастание в ИМ количества нейтрофилов и лимфоцитов свидетельствовало об активной миграции этих клеток в дыхательные пути при утяжелении болезни. Также в ИМ больных ВП отмечались эпителиоциты, единичные эозинофилы и бактерии различной формы — диплококки и палочковидные микроорганизмы. Необходимо отметить, что наряду с выявленным повышением количества нейтрофилов и лимфоцитов в ИМ больных ВП наблюдалось уменьшение количества макрофагов, а их минимальное значение отмечалось при тяжелом течении заболевания ( $18.4 \pm 3.1 \%$  при показателе для доноров  $64.2 \pm 5.7 \%$ ,  $P < 0.001$ ).

Известно, что гибель клеток путем некроза является закономерным результатом реализации дезинтеграционных внутриклеточных процессов, инициированных экстремальными факторами (Новиков, 1996). Разрушение клеточных мембран в результате некроза приводит к высвобождению лизосомных ферментов, которые усиливают дезинтеграцию окружающих тканей и вызывают развитие и прогрессирование воспаления. Исследование ИМ здоровых лиц показало, что количество жизнеспособных лимфоцитов в 3 раза превышало количество некротизированных, а содержание жизнеспособных нейтрофилов и макрофагов в 1.9 и 2.1 раза выше, чем ИН для этих клеток ( $P < 0.05$ ) (табл. 2). Эпителиоциты были представлены в основном в виде нежизнеспособных клеток.

При ВП в ИМ больных наблюдали увеличение количества поврежденных клеток ( $P < 0.05$  по сравнению с контролем). Причем содержание некротизированных нейтрофилов и макрофагов в ИМ зависело от тяжести течения болезни. Наибольшее количество некротически измененных макрофагов выявляли в ИМ больных тяжелой ВП. ИН для этой группы больных превышал значение ИН

Таблица 1

## Клеточный состав индуцированной мокроты больных ВП на стадии разгара заболевания

Показатели	Доноры, контроль, <i>n</i> = 30	Больные ВП		
		легкое течение, <i>n</i> = 11	среднетяжелое течение, <i>n</i> = 14	тяжелое течение, <i>n</i> = 8
Жизнеспособность всех кле- ток, %	98.1 ± 0.8	96.3 ± 1.1	91.7 ± 1.5 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.01	74.2 ± 2.5 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>3</sub> < 0.001
Макрофаги, %	64.2 ± 5.7	37.4 ± 3.8 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001	23.7 ± 2.9 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.01	18.4 ± 3.1 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001
Нейтрофилы, %	27.2 ± 3.3	49.1 ± 3.6 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001	58.4 ± 3.9 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001	66.8 ± 4.1 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001
Лимфоциты, %	5.4 ± 1.4	8.8 ± 1.5	12.3 ± 1.9 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0.01	9.3 ± 1.7
Эпителиоциты, %	2.6 ± 0.8	4.4 ± 0.8	5.1 ± 1.1	5.2 ± 1.1
Эозинофилы, %	0.12 ± 0.02	0.2 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.04

Примечание. Достоверность различий: *P*<sub>1</sub> — по сравнению с показателями контрольной группы, *P*<sub>2</sub> — с аналогичными показателями при легком течении ВП, *P*<sub>3</sub> — с аналогичными показателями при среднетяжелой ВП.

для здоровых лиц в 4.1 раза (*P* < 0.05) (табл. 2). В ИМ больных среднетяжелой ВП наблюдалось одномоментное повышение количества поврежденных нейтрофилов и макрофагов, а показатели некроза превышали значение таковых в ИМ доноров в 2.6 и 2.8 раза соответственно. На наш взгляд, нарастание по мере утяжеления ВП числа некротизированных макрофагов на фоне уменьшения их доли в ИМ свидетельствует о несостоятельности местных факторов защиты организма у больных со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания.

Для изучения гибели клеток путем апоптоза мы использовали ядерный краситель Hoechst 33342, который связывается с поврежденными участками ДНК клеток. С помощью люминесцентной микроскопии выявляются клетки на различных стадиях апоптоза. Самым ранним проявлением этой формы гибели клеток является резко очерченное уплотнение ядерного хроматина в виде гомогенной массы с равномерным зеленым свечением (рис. 1, а). На этой стадии апоптоз может быть приостановлен под действием ингибиторов, в связи с чем данная стадия

развития клеточной гибели обозначается как преапоптоз (Simon, 2003). Промежуточная стадия апоптотической гибели клетки сопровождается уменьшением размеров ядра и его конволюцией. Ядро клетки в конечной стадии апоптоза распадается на дискретные фрагменты, число которых колеблется от 3 до 5 (рис. 1, б).

При ВП в ИМ больных также установлено повышение числа апоптотически измененных клеток. Причем различие между показателями ИА в клетках ИМ больных с разным течением заболевания было недостоверным, и гибель клеток путем апоптоза преимущественно выявлялась в популяции макрофагов. Так, количество апоптотически измененных макрофагов в ИМ больных превышало их значение для здоровых лиц в среднем в 4.7 раза (*P* < 0.05) (табл. 2). Возрастало и число апоптотически измененных нейтрофилов в 2.8 раза. Тем не менее полученные данные о клеточном составе и повреждении клеток ИМ позволяют предположить, что ведущее значение при ВП принадлежит нейтрофилам. На это указывают установленные нами небольшие значения индексов некроза и

Таблица 2

## Показатели повреждения клеток индуцированной мокроты больных ВП при легком (ЛТ), среднем (СТ) и тяжелом (ТТ) течении болезни

Клетки	Доноры, контроль, <i>n</i> = 30		ЛТ, <i>n</i> = 11		СТ, <i>n</i> = 14		ТТ, <i>n</i> = 8		Среднее по группе, <i>n</i> = 33	
	ИН	ИА	ИН	ИА	ИН	ИА	ИН	ИА	ИН	ИА
Лимфоциты	1.3 ± 0.2	0	0.501 ± 0.030	0	3.7 ± 0.4	0.51 ± 0.01	9.1 ± 0.7	0	4.41 ± 0.36	0
Нейтрофилы	5.8 ± 0.3	10.8 ± 0.9	13.5 ± 0.9	22.9 ± 1.5	15.0 ± 1.2	29.9 ± 1.7	2.1 ± 0.6	20.0 ± 1.5	10.2 ± 1.1	24.3 ± 4.1
Макрофаги	12.5 ± 1.1	12.5 ± 1.1	16.5 ± 1.1	53.0 ± 4.6	35.7 ± 2.4	60.6 ± 5.5	51.5 ± 2.4	59.2 ± 4.7	34.6 ± 2.5	57.6 ± 3.3
Эпителиоциты	25.6 ± 2.8	0	12.5 ± 1.3	0	5.1 ± 0.6	1.11 ± 0.07	0	0	5.8 ± 0.4	



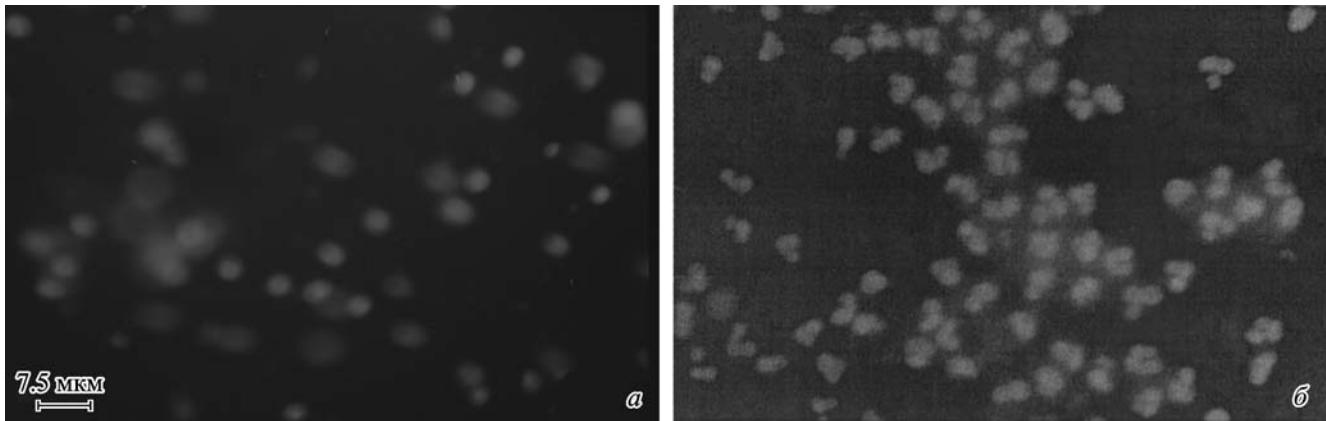


Рис. 1. Конденсация хроматина в ядрах клеток индуцированной мокроты (ИМ).

*a* — у здоровых людей, *б* — у больных среднетяжелой ВП.

апоптоза нейтрофилов по сравнению с этими показателями гибели для макрофагов на фоне повышенной рекрутизации этих клеток в место воспаления.

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов ИМ больных ВП показало, что неспецифическая резистентность организма у данных больных в значительной степени связана с тяжестью течения заболевания. Так, у больных легкой ВП при поступлении в стационар наблюдали увеличение поглотительной активности фагоцитов крови и ИМ, тогда как при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания наблюдали ее снижение, более выраженное при тяжелой пневмонии. ФП для клеток крови у доноров через 30 мин контакта с тест-бактериями составили  $8.2 \pm 3.5\%$ , для клеток ИМ —  $73.1 \pm 4.4\%$ . У больных ВП с легким течением ФП не отличались от таковых у доноров, тогда как у среднетяжелых больных эти показатели снижались ( $P < 0.01$ ), причем через 120 мин ФП увеличилось только в клетках ИМ в 1.36 раза ( $P < 0.01$ ), не достигая показателей контроля. Еще более низкое ФП оказалось у больных с тяжелым течением пневмонии: для клеток крови оно составило  $26.3 \pm 1.9\%$ , а для клеток ИМ —  $21.7 \pm 3.7\%$ .

При определении ФЧ выявлено, что через 120 мин инкубации для клеток крови доноров это число снижалось, что указывало на внутриклеточное переваривание микроорганизмов. У больных легкой пневмонией ФЧ было выше ( $P < 0.001$ ), чем у доноров, как для клеток крови, так и для фагоцитов ИМ. У пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания этот показатель был ниже контроля. В дальнейшем у этих больных отмечали внутриклеточное размножение бактерий, о чем свидетельствовало повышение ФЧ. Так, для клеток ИМ, больных среднетяжелой степенью пневмонии ФЧ через 120 мин контакта увеличилось в 2.17 раза ( $P < 0.01$ ), а при тяжелом заболевании — в 8.6 раза ( $P < 0.001$ ). Показатель завершенности фагоцитоза для таких больных соответственно составил  $0.46 \pm 0.05$  и  $0.12 \pm 0.02$  при значении для здоровых лиц  $1.4 \pm 0.22$  ( $P < 0.001$ ).

Поскольку ФП выявляют «конечный результат», т. е. разрушение бактерий, не отражая при этом изменения самих клеток, нами одновременно с этими исследованиями проведена оценка активности внутриклеточных ферментных систем.

С помощью НСТ-теста, отражающего суммарную активность NADP-зависимых ферментов дыхательной цепи, у здоровых лиц обнаружено, что значения показате-

лей ферментативной активности клеток ИМ достоверно превышают таковые для клеток крови ( $P < 0.05$ ). Подобная зависимость была получена при исследовании активности МПО в фагоцитах этих лиц. Показатели положительной реакции на этот фермент для клеток ИМ составили  $0.802 \pm 0.070$  и для фагоцитов крови —  $0.778 \pm 0.06$  усл. ед. ( $P < 0.05$ ). Также в фагоцитах ИМ были выше показатели активности КБ. В целом эти данные указывают на повышенную по сравнению с клетками крови бактерицидную активность фагоцитов ИМ здоровых лиц. Подобное повышение ферментативной и фагоцитарной активности клеток ИМ объясняется непосредственным контактом клеток с внешней средой и постоянной микробной агрессией.

Показатели ферментативной активности фагоцитов больных ВП в период разгара заболевания зависели от тяжести течения заболевания (рис. 2, *a*). Так, в клетках ИМ больных легкой ВП обнаружено уменьшение цитохимической реакции на неферментные катионные белки (КБ) и 5'-нуклеотидазу ( $P < 0.05$ ) и, напротив, повышение по сравнению с показателями для здоровых лиц активности МПО ( $P < 0.001$ ). Показатели НСТ-теста и кислой фосфатазы для клеток ИМ этих больных не отличались от контроля. У пациентов со среднетяжелым течением ВП повышалась определяемая в НСТ-тесте продукция активных кислородных метаболитов фагоцитами при наличии высокой активности МПО. Это указывало на активацию кислородзависимой бактерицидной системы клеток ИМ, причем у этой группы больных также увеличивалась активность кислой фосфатазы, которая является показателем переваривающей способности макрофагов (рис. 2, *a*). При тяжелом течении пневмонии в фагоцитах выявлялось снижение продукции свободных кислородных радикалов, определяемое в НСТ-тесте, при значительном повышении активности МПО, что носило компенсаторный характер (рис. 2, *a*), так как известно, что этот фермент отражает активность защитной системы клеток от чрезмерного образования реактивных форм кислорода.

Известно, что NO включен в механизмы неспецифического иммунитета и частично — в комплексный механизм тканевого повреждения через модуляцию воспалительного процесса и апоптоза (Сомова, Плехова, 2006). При формировании воспалительных очагов образование NO нейтрофилами и макрофагами стимулируется бактериальными липосахаридами, цитокинами и другими агентами. При исследовании уровня метаболитов NO нами установлено, что у здоровых лиц показатели в суперна-

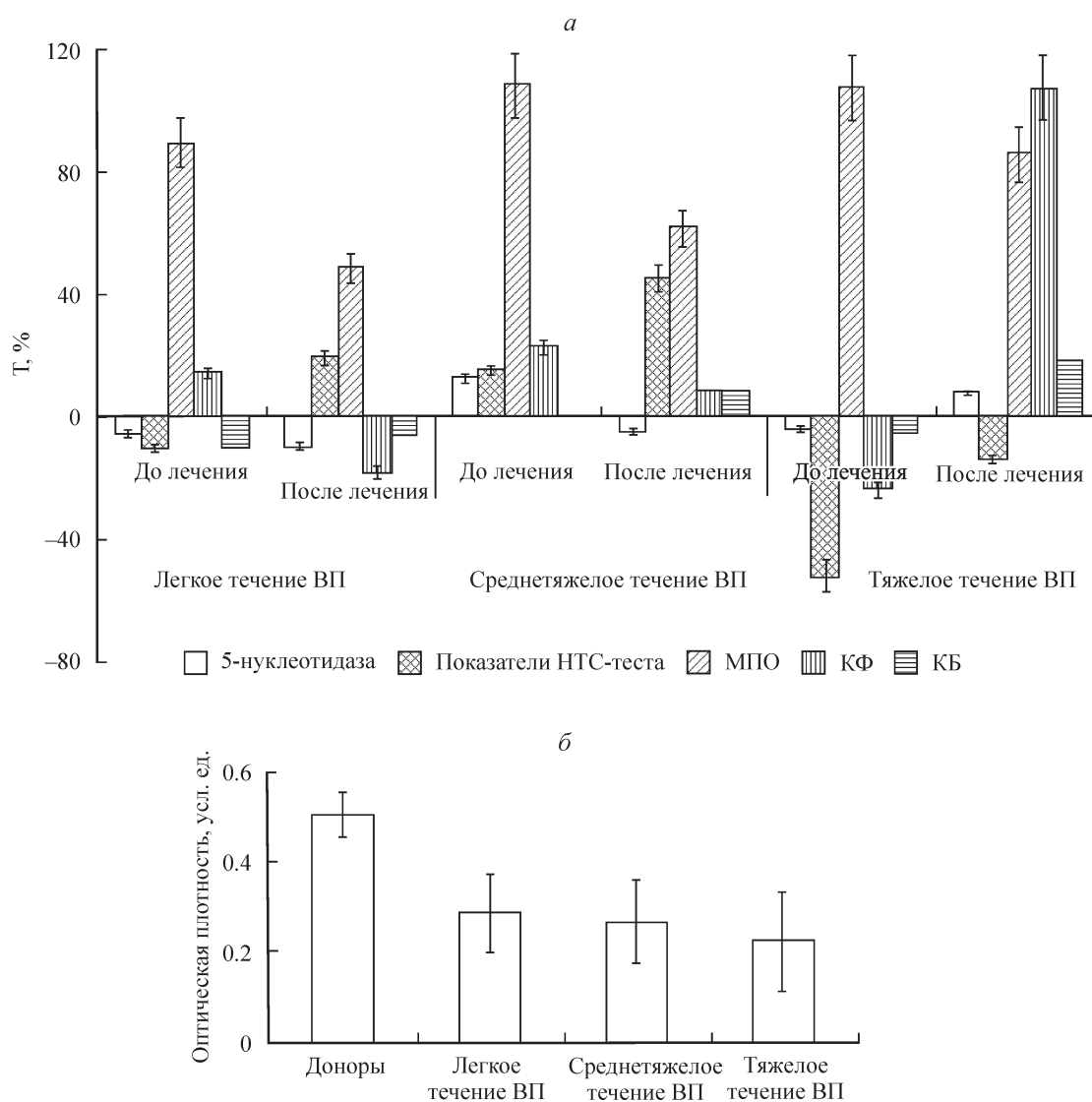


Рис. 2. Показатели функциональной активности клеток ИМ у больных ВП различной степени тяжести.

*а* — показатели ферментативной активности клеток ИМ, *б* — количество метаболитов NO в супернатанте ИМ. Для доноров индекс стимуляции (Т) равен 0. Формулу вычисления индекса стимуляции Т см. в разделе «Материал и методика».

танте ИМ намного превышают показатели в сыворотке крови (рис. 2, *б*). У больных ВП отмечается общая, не зависящая от тяжести течения заболевания тенденция к понижению содержания метаболитов NO в супернатанте ИМ, тогда как в сыворотке крови, напротив, отмечается их повышение.

В динамике заболевания на 10-е сут применения традиционной терапии у больных ВП легкой степени тяжести отмечали нормализацию фагоцитарных показателей клеток ИМ, которая сопровождалась снижением активности ферментов, отражающих кислороднезависимую бактерицидность лейкоцитов (рис. 2, *а*). У больных среднетяжелой ВП фагоцитарные показатели лейкоцитов ИМ незначительно возрастали к 10-м сут терапии, оставаясь ниже значений контрольной группы ( $P < 0.05$ ). Анализ ферментативной активности фагоцитов у этой группы больных показал, что повышенный при поступлении уровень МПО в клетках ИМ нормализовался и уменьшалась цитохимическая реакция на КБ и кислую фосфатазу (рис. 2, *а*).

На фоне традиционного лечения была установлена тенденция к повышению фагоцитарных показателей у

больных тяжелой ВП, однако все показатели, характеризующие фагоцитоз, были ниже соответствующих значений для больных с легким и среднетяжелым течением заболевания и здоровых лиц. При исследовании активности ферментов клеток ИМ у больных тяжелой ВП обнаружено снижение уровней всех изучаемых ферментов по сравнению с соответствующими показателями до лечения (рис. 2, *а*). Таким образом, исследования фагоцитарной и ферментативной активности клеток местной защиты больных ВП показали, что состояние неспецифической резистентности организма этих больных в значительной степени определяет тяжесть течения заболевания и лечение антибиотиками не оказывает влияния на нормализацию функций нейтрофилов и макрофагов.

## Обсуждение

Приток стимулированных нейтрофилов в легкие относится к критическому компоненту защиты организма при пневмонии, поскольку эти клетки принимают актив-

ное участие в элиминации бактерий в очаге воспаления (Zhang et al., 2000; Abraham, 2003; Martens et al., 2004). Макрофагам — другим клеточным элементам врожденного иммунитета организма — также принадлежит важная роль в санации очага воспаления как от патогенов, так и от компонентов погибших в результате апоптоза или некроза клеток, в том числе и нейтрофилов (Cox et al., 1995; Suzuki et al., 2008). Проведенное нами цитологическое исследование ИМ больных ВП показало повышение количества нейтрофилов и лимфоцитов и, напротив, снижение числа макрофагов по мере утяжеления заболевания. Исследование жизнеспособности этих клеток обнаружило повышение показателей некроза и апоптоза для нейтрофилов в ИМ у больных со среднетяжелым и тяжелым течением ВП. Причем достоверные различия у пациентов этих групп были обнаружены только между показателями некроза, тогда как различие между показателями апоптоза было недостоверным, и гибель клеток этим путем выявлялась преимущественно в популяции макрофагов. Таким образом, на наш взгляд, изучение ИМ на предмет наличия некротизированных клеток в зависимости от степени тяжести заболевания является более информативным, чем исследование этих клеток на предмет апоптоза.

На основании полученных нами данных исследования клеточного состава и вариантов гибели клеток ИМ больных ВП можно утверждать, что ведущее место при ВП принадлежит нейтрофилам. На фоне повышенного рекрутирования этих клеток в очаг воспаления выявлены небольшие значения показателей некроза и апоптоза по сравнению с показателями гибели для макрофагов. Известно, что нейтрофилы в большом количестве постоянно продуцируются в костном мозге, и для сохранения состояния клеточного гомеостаза некоторое количество этих клеток должно погибать в течение определенного периода. Нейтрофилы, используя сигналы от экстрацеллюлярного матрикса, продукты жизнедеятельности микроорганизмов и медиаторы воспаления, а также собственные ресурсы аутокринной (паракринной) регуляции, способны усиливать экспрессию проапоптотических факторов (Watson et al., 1997). При многих острых и хронических инфекциях, в том числе и пневмониях, гибель нейтрофилов путем апоптоза относится к важному механизму выживания организма, когда апоптотические тельца этих клеток уничтожаются макрофагами (Simon, 2003; Conus et al., 2008).

При исследовании апоптоза и определении степени экспрессии рецепторов CD95, CD11b, CD66b, CD64 и CD114 в клетках крови и бронхоальвеолярного смыва больных ВП по сравнению с донорами было выявлено повышение показателя апоптоза для системных нейтрофилов и его понижение для клеток очага воспаления (Droemmann et al., 2000, 2006). Нами определено, что ИА для нейтрофилов крови больных ВП не отличался от показателей для доноров, тогда как в ИМ он значительно возрос. На наш взгляд, это связано с особенностями клинического течения этого заболевания, вызываемого возбудителем, отличающимся от бактерий — инфектов ВП в Европе. Повышение количества апоптотически измененных нейтрофилов обнаружено также при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме, и авторами указывалось, что уменьшение апоптоза нейтрофилов и дисрегуляция функций макрофагов приводят к хронической инфекции при повреждении легких (Plataki et al., 2006).

В отношении макрофагов интерес представляют данные о том, что по мере утяжеления течения ВП повышается количество как некротизированных макрофагов, так и апоптотически измененных при уменьшении их числа в ИМ. На наш взгляд, это свидетельствует о несостоятельности местных факторов защиты организма у больных среднетяжелой и тяжелой пневмонией. Это подтверждает выявленное нами увеличение поглотительной активности фагоцитов у больных легкой ВП, тогда как при ВП средней и тяжелой степени у пациентов наблюдали ее снижение, более выраженное при тяжелой пневмонии.

В настоящее время известны два отчетливо различных функциональных состояния фагоцитов: исходное, так называемое *gedox*, с низким уровнем протекания процессов и активированное — праймированное, переход в которое обусловлен взаимодействием клеток с различными стимуляторами (Клебанов, Владимиров, 1999). При этом в процессе предварительного воздействия стимулов, в том числе бактерий, отмечается увеличение функционального потенциала нейтрофилов и макрофагов: усиление миграции, адгезии, дегрануляции и метаболизма. На основании полученных нами данных исследования функционального состояния фагоцитов больных ВП можно утверждать, что в случае легкого и среднетяжелого заболеваний в месте воспаления эти клетки находятся в праймированном состоянии и способны активно участвовать в освобождении организма от возбудителя. Из изученного спектра ферментативной активности фагоцитов ИМ больных легкой ВП к наиболее значимым изменениям мы отнесли усиление цитохимической реакции на МПО, одного из компонентов кислородзависимой бактерицидной системы, и снижение активности 5'-нуклеотидазы, маркера клеточных мембран, что свидетельствует об активации лейкоцитов. У пациентов со среднетяжелой пневмонией наблюдали повышение спонтанной и индуцированной продукции фагоцитами реактивных кислородных метаболитов (НСТ-тест), а также усиление реакции на МПО. Это указывало на стимуляцию кислородзависимой бактерицидной системы и состояние праймированности фагоцитов. У этой группы больных в клетках ИМ также увеличивалась активность КФ, которая является показателем перерабатывающей способности макрофагов. При тяжелом течении ВП в разгар заболевания в фагоцитах выявляли нарушение продукции свободных кислородных радикалов, которое сопровождалось значительным повышением активности МПО, что носило компенсаторный характер. При сопоставлении данных, полученных у тех же больных после 10-суточной терапии, обнаружено снижение показателей ферментативной активности фагоцитов до уровня показателей для здоровых лиц, кроме клеток ИМ пациентов с тяжелым течением ВП.

В настоящее время в связи с вновь открытыми и пересмотренными ранее известными функциональными свойствами нейтрофилов внесены изменения в понимание регулирующего влияния этих клеток на защиту организма при инфекционной патологии. Оно включает в себя продукцию и экзоцитоз нейтрофилами различных факторов, модулирующих функции лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. Известно, что стимулирующие макрофаги факторы, которые появляются в экссудате и в сыворотке крови при остром воспалении, связаны с активированными нейтрофилами. Особый интерес при исследовании белков цитоплазматических гранул нейтрофилов (а их более 40) вызывают неферментные бактерицидные белки с низкой молекулярной массой, которые обладают суммарным по-



ложительным зарядом и бактерицидным действием. Эти протеины являются специфическими маркерами нейтрофилов и способны играть роль медиаторов воспаления, факторов проницаемости, стимуляторов метаболических процессов и т. д., т. е. выступать в роли физиологических медиаторов (Плехова, 2006). Обнаруженное нами снижение внутриклеточного содержания неферментных КБ в нейтрофилах больных легкой и среднетяжелой ВП указывает на активное участие этих биологически активных соединений в защите организма.

В целом проведенные нами исследования состояния фагоцитов очага воспаления показали, что у больных ВП значительно увеличивается количество нейтрофилов с максимальными показателями при тяжелом течении болезни, а также наблюдается угнетение функциональной активности фагоцитов, которое связано с увеличением количества некротически и апоптотически измененных макрофагов. Таким образом, на наш взгляд, оценка состояния клеточных элементов врожденного иммунитета в месте воспаления позволяет установить роль фагоцитов в процессе выздоровления организма, а также прогнозировать течение заболевания.

#### Список литературы

- Авдеев С. Н., Чучалин А. Г. 2001. Тяжелая внебольничная пневмония. Русский мед. журн. 9 (5) : 177—178.
- Березняков И. Г., Губина О. С. 2000. Антибактериальное лечение внебольничных пневмоний: теория и практика. Провизор. 2 : 21—28.
- Голофеевский В. Ю., Лисовский В. А. 2004. Частная патология (внутренние болезни): Учебное пособие М.: Советский спорт. 280 с.
- Земсков А. М., Земсков В. М., Караулов А. В. 2000. Иммунопатология и иммунокоррекция НВЗЛ. М.; Воронеж. 440 с.
- Клебанов Г. И., Владимиров Ю. А. 1999. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов. Успехи соврем. биол. 119 (5) : 462—475.
- Новиков В. С. 1996. Программированная клеточная гибель. СПб.: Наука. 250 с.
- Плехова Н. Г. 2006. Бактерицидная активность фагоцитов. Журн. эпидемиол. микробиол. иммунобиол. 6 : 89—96.
- Плехова Н. Г., Сомова Л. М., Дробот Е. И., Крылова Н. В., Леонова Г. Н. 2007. Изменение метаболической активности макрофагов под влиянием вируса клещевого энцефалита. Биохимия. 72 (2) : 236—246.
- Сомова Л. М., Плехова Н. Г. 2006. Оксид азота как медиатор воспаления. Вестн. ДВО РАН. 2 : 77—80.
- Хаитов Р. М., Земсков В. М. 1995. Некоторые избранные проблемы функциональной активности макрофагов. Журн. эпидемиол. микробиол. иммунобиол. 3 : 27—32.
- Чучалин А. Г., Синопальников А. И., Страчунский Л. С., Козлов Р. С., Рачина С. А., Яковлев С. В. 2005. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: Атмосфера. 66 с.
- Abraham E. 2003. Neutrophils and acute lung injury. Crit. Care Med. 31 : 195—199.
- Alexis N., Soukup J., Ghio A., Becker S. 2000. Sputum phagocytes from healthy individuals are functional and activated: a flow cytometric comparison with cells in bronchoalveolar lavage and peripheral blood. Clin. Immunol. 97 : 21—32.
- Bonnard P., Douadi Y., Laurans G. 2005. Community-acquired bacteraemic pneumococcal pneumonia in adults: effect of diminished penicillin susceptibility on clinical outcome. J. Infect. 51 : 69—76.
- Conus S., Perozzo R., Reinheckel T., Peters C., Scapozza L., Yousefi S., Simon H.-U. 2008. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. J. Exp. Med. 205 : 685—698.
- Cox G., Crossley J., Xing Z. 1995. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 12 : 232—237.
- Droemann D., Aries S. P., Hansen F., Moellers M., Braun J., Katus H. A., Dalhoff K. 2000. Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. CHEST. 117 : 1679—1684.
- Droemann D., Hansen F., Aries S. P., Braun J., Zabel P., Dalhoff K., Schaaf B. 2006. Neutrophil apoptosis, activation and anti-inflammatory cytokine response in granulocyte colony-stimulating factor-treated patients with community-acquired pneumonia. Respiration. 73 : 340—346.
- Haslett C. 1997. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. Brit. Med. Bull. 53 : 669—683.
- Liles W. C., Kiener P. A., Ledbetter J. A., Aruffo A., Klebanoff S. J. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. J. Exp. Med. 184 : 429—440.
- Martens P., Worm S. W., Lundgren B., Lundgren B., Konradsen H. B., Benfield T. 2004. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. BMC Infect. Dis. 4 : 21—25.
- Niedermaier M. S., Mandell L. A., Anzueto A., Bass J. B., Broughton W. A., Campbell G. D., Dean N., File T., Fine M. J., Gross P. A., Martinez F., Marrie T. J., Plouffe J. F., Ramirez J., Sarosi G. A., Torres A., Wilson R., Yu V. L. 2001. Guidelines for management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity antimicrobial therapy, and prevention. The official statement of the American Thoracic Society was approved by the ATC board of directors. Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 163 : 1730—1754.
- Plataki M., Tzortzaki E., Ryttila P., Demosthenes M., Koutsopoulos A., Siafakas N. M. 2006. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD (chronic obstructive pulmonary disease). Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 1 : 161—171.
- Simon H. U. 2003. Targeting apoptosis in the control of inflammation. Eur. Respir. J. (Suppl.). 44 : 20—21.
- Suzuki T., Chow C. W., Downey G. P. 2008. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40 : 1348—1361.
- Watson R. W., Rotstein O. D., Nathens A. B., Parodo J., Marshall J. C. 1997. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. J. Immunol. 158 : 945—953.
- Zhang P., Summer W. R., Bagby G. J., Nelson S. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. Immunol. Rev. 173 : 39—51.



## CELLULAR FACTORS OF LOCAL PROTECTION UNDER COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA

*N. M. Kondrashova,<sup>1</sup> N. G. Plekhova,<sup>2,\*</sup> D. V. Zavorueva,<sup>1</sup> L. M. Somova,<sup>2</sup>  
B. I. Geltser,<sup>1</sup> A. V. Kostyushko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Vladivostok State Medical University and <sup>2</sup> The Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Siberian Branch of RAMS, Vladivostok;  
\* e-mail: pl\_nat@hotmail.com

The community acquired pneumonia (CAP) falls into the category of the most frequent human diseases and is one of the leading causes of death from infectious diseases. The main components that characterize the inflammatory process in the lungs at CAP include an increase in vascular permeability, and migration of neutrophils and monocytes/macrophages to the foci of infectious agents inoculation, and the reactivity of these cells defines the upshot of the disease. In the present work, a significant increase in the number of neutrophils and an increase in the number of perishing cells depending on the gravity of current CAP were determined. Herewith, the contents of necrotic neutrophils and macrophages in foci of inflammation dependent on the gravity of current CAP, while the difference between the factors of apoptosis in these patients was not reliable. Apoptotic cell death was mainly revealed in population of macrophages. Analysis of the phagocytic and enzymatic activities of cells of the local defense of CAP patients showed that the state of unspecific resistance of their organisms largely determined the severity of the disease and antibiotic treatment did not affect the normalization of neutrophils and macrophages functions.

**Key words:** apoptosis, neutrophils, monocytes/macrophages, community acquired pneumonia.

---